

ENTWICKLUNG STABILER WIRTS-/VEKTORSYSTEME
ZUR STAMMVERBESSERUNG
BIOTECHNOLOGISCH RELEVANTER BAKTERIEN

Konstruktion eines rekombinationsdefekten

Methylomonas clara Stammes

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Ruhr-Universität Bochum

von
RÜDIGER RIDDER
aus
Recklinghausen

Bochum 1989





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546602_0015

Entwicklung stabiler Wirts-/Vektorsysteme
zur Stammverbesserung biotechnologisch relevanter Bakterien

Konstruktion eines rekombinationsdefekten
Methylomonas clara Stammes

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Ruhr-Universität Bochum

von
Rüdiger Ridder
aus Recklinghausen

Bochum 1989

meinen Eltern

Herrn Professor Dr. Dr. h.c. Karl Esser, meinem akademischen Lehrer und Doktorvater, danke ich herzlich für seine großzügige Unterstützung, seine Förderung in allen Bereichen und sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Birgit Jacobowsky für ihren unermüdlichen und engagierten Einsatz, der im entscheidenden Maße zur praktischen Durchführung dieser Arbeit beigetragen hat.

Herrn Dr. R. Marquardt (Frankfurt) danke ich herzlich für eine Vielzahl wertvoller Ratschläge und Diskussionen sowie für das Überlassen einiger der in dieser Arbeit eingesetzten Stämme und Plasmide.

Herrn Prof. Dr. U. Kück, Herrn Dr. H.D. Osiewacz und Herrn Dr. F. Kempken möchte ich meinen Dank für ihre ständige Diskussionsbereitschaft und zahlreichen Hinweise aussprechen.

Herrn Dr. Th. Karsch (Kundl) möchte ich für die Einarbeitung in die DNA-Sequenzanalyse, Frau U. Heinen für die Einführung in die Lambda-Klonierungstechnik und Frau I. Godehardt für Ratschläge zur *in vitro*-Mutagenese danken.

Allen übrigen technischen und wissenschaftlichen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Allgemeine Botanik sei mein Dank für ihre Unterstützung ausgesprochen.

Bei Herrn Prof. Dr. E. Lanka (Berlin) möchte ich mich für die Überlassung der *E.coli* *recA*-Gensonde bedanken.

Entwicklung stabiler Wirts-/Vektorsysteme
zur Stammverbesserung biotechnologisch relevanter Bakterien

Konstruktion eines rekombinationsdefekten
Methylomonas clara Stammes

	Seite
I. Einführung	1
A) Grundlagen der Stammverbesserung biotechnologisch relevanter Bakterien	2
B) Entwicklung stabiler Wirts-/Vektorsysteme	5
1. Entwicklung stabiler Expressionsvektoren	9
a) Regulation der Genexpression	10
b) Stabile Replikation der Expressionsvektoren	13
2. Entwicklung geeigneter Wirtsstämme für die Gen- Expression	15
a) Restriktion und Modifikation heterologer DNA- Sequenzen	16
b) Strukturelle DNA-Instabilität durch Rekombina- tion	18
c) Instabilität der rekombinanten Genprodukte	22
II. Problemstellung	26
III. Material und Methoden	31
IV. Ergebnisse	38
A) Isolierung des <i>Methylomonas clara recA</i> -Genes	38
1. Identifizierung des Genes durch heterologe Hybridisierung	38
2. Konstruktion einer <i>M.clara</i> -Genbank	40
B) Bestimmung der DNA-Sequenz des <i>recA</i> -Genes	41
C) Nachweis der Expression des <i>recA</i> -Genes in <i>E.coli</i>	44
1. Genüberexpression in <i>E.coli</i>	44
2. Spezifische Protein-Markierung	46
D) Physiologischer Aktivitätsnachweis durch Komplemen- tation	47
E) <i>In vitro</i> -Modifizierung des <i>M.clara recA</i> -Genes	50
1. <i>In vitro</i> -Mutagenese	52
2. Insertions-Inaktivierung	54

F) Genaustausch in <i>Methylobacterium</i> <i>clara</i>	55
1. Konjugativer Gentransfer	56
2. Selektion <i>recA</i> -negativer <i>M.clara</i> -Stämme	57
3. Molekulare Analyse der <i>M.clara recA</i> -Mutanten	58
G) Physiologischer Nachweis der <i>M.clara recA</i> -Gen-Inaktivierung	63
V. Diskussion	64
A) Isolierung und Identifizierung des <i>M.clara recA</i> -Genes	64
1. Identifizierung durch heterologe Hybridisierung	65
2. Das <i>M.clara recA</i> -Gen und die <i>recA</i> -Gene von <i>Escherichia coli</i> und <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sind stark konserviert	67
B) Analyse von Expressionssignalen des <i>M.clara recA</i> -Genes	73
C) Expression des <i>M.clara recA</i> -Genes in <i>E.coli</i>	76
1. Das klonierte <i>Methylobacterium clara</i> DNA-Fragment kodiert für ein 37 kD großes Protein	76
2. Das <i>M.clara recA</i> -Genprodukt komplementiert die <i>recA</i> -Mutation von <i>E.coli</i> HB101	77
D) Austausch des nativen <i>M.clara recA</i> -Genes durch die <i>in vitro</i> -inaktivierte Genkopie	77
VI. Zusammenfassung	82
VII. Literatur	84
VIII. Anhang	102

Abkürzungen

A	Adenin
bp	Basenpaare
C	Cytosin
Ci	Curie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dATP	Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5'-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
dNTP	Desoxynucleosid-5'-Triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure- Dinatriumsalz
G	Guanin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
mM	millimolar
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
PEG	Polyethylenglykol
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	einzelsträngig
SSPE	engl: "standard saline phosphate EDTA"
T	Thymin
Tris	Tris (Hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil
Upm	Umdrehungen pro Minute

Allgemein übliche Abkürzungen sowie die gebräuchlichen Maßeinheiten werden nicht gesondert aufgeführt.



I. Einführung

Unter dem Begriff "Biotechnologie" versteht man die integrierte Anwendung der Mikrobiologie, Biochemie und Verfahrenstechnik, um die Fähigkeiten von Mikroorganismen, Zell- und Gewebekulturen sowie isolierten Enzymen für industrielle Prozesse zu nutzen (Crueger und Crueger 1989).

Bereits seit Jahrtausenden werden (meist empirisch entwickelte) mikrobiologische Verfahren zur Herstellung von Nahrungsmitteln angewendet, z.B. die Fruchtsaftvergärung und die Brotsäuerung. Um die Jahrhundertwende wurden die ersten gezielten Verfahren eingeführt, um die Stoffwechselleistungen von Mikroorganismen für die Herstellung von Primärmetaboliten wie Zitronensäure, Milchsäure und Alkohol auszunutzen. Die Einführung der Steriltechnik und weiterer verfahrenstechnischer Modifikationen zur großtechnischen Handhabung von Mikroorganismen in den 40er Jahren waren bedeutende Fortschritte. Erst dadurch wurde die Entwicklung biotechnologischer Prozesse zur industriellen Produktion von Biomasse, sekundären Stoffwechselprodukten und die Durchführung mikrobieller Stoffumwandlungen (Biotransformationen) ermöglicht.

Neben den "neueren" biotechnologischen Prozessen mit pflanzlichen und tierischen Zellkulturen sowie mit immobilisierten Enzymen nehmen die auf den Stoffwechselleistungen von Mikroorganismen basierenden Verfahren auch heute noch eine dominierende Rolle ein. Unter diesen biotechnologisch interessanten Mikroorganismen befinden sich eine Vielzahl von Bakterien, die sich für industrielle Fermentationsprozesse anbieten.

Eine Übersicht über biotechnologisch relevante Bakterien sowie deren Verwendung in technischen Prozessen wird von Esser und Meinhardt (1984) gegeben.

Der Grund für diese zahlreichen Verwendungsmöglichkeiten von Bakterien in biotechnologischen Prozessen liegt (neben der einfachen prokaryotischen Struktur und der damit verbundenen hohen Wachstumsrate) vor allem in der Vielseitigkeit der Substratverwertungsmöglichkeiten. Die Gesamtheit der Bakterien kann nahezu jede, von anderen mikrobiellen, pflanzlichen oder tierischen Organismen synthetisierte Substanz vollständig oder zumindest

teilweise abbauen. Die einzelnen Bakterienarten hingegen sind in der Regel in ihren Verwertungsmöglichkeiten auf spezifische Substrate bzw. Substratgruppen beschränkt (Crueger und Crueger 1989).

Diese stoffwechselphysiologischen Vorzüge der Bakterien sind insbesondere im Hinblick auf zwei Aspekte von biotechnologischer Bedeutung:

1. Eine Vielzahl von Kohlenhydraten, organischen Säuren und C1-Verbindungen (wie z.B. Methan, Methanol und Kohlendioxide), die bei industriellen Fertigungsprozessen als Abfallprodukte auftreten, können in bakteriellen Fermentationsprozessen als Kohlenstoffquelle dienen (Schlegel 1984). Aufgrund des hohen Anteils der Substratkosten an den Gesamtkosten fermentativer Produktionsverfahren ist diese vielseitige Verwertbarkeit von großem ökonomischen Interesse.
2. Unter den im Verlaufe industrieller Produktionsverfahren entstehenden Abfällen befinden sich eine Anzahl von umweltbelastenden Substanzen (z.B. aromatische Kohlenwasserstoffe wie Benzol und Phenol, in vielen Fällen chlorierte Verbindungen), die nur mit Hilfe aufwendiger technischer Verfahren degradiert werden können. Die Fähigkeit einiger Bakterienarten (hauptsächlich Vertreter der Gattung *Pseudomonas*), diese Verbindungen teilweise oder vollständig abzubauen, ist von zunehmender Bedeutung (Übersicht: Lingens 1988).

A) Grundlagen der Stammverbesserung biotechnologisch relevanter Bakterien

In den letzten Jahrzehnten sind eine Vielzahl von Verfahren zur Produktion von Primär- und Sekundärmetaboliten durch Bakterien entwickelt worden. Am Beginn der Entwicklung solcher Verfahren steht das systematische Suchen ("Screening") nach Produzenten neuartiger Metabolite. Die im Verlaufe dieser Screeningprogramme aus der Natur isolierten Wildstämme eignen sich jedoch aufgrund der in der Regel geringen Produktausbeute nicht für die Verwendung in industriellen Fermentationsprozessen. Um die für ein wirtschaftliches Verfahren erforderliche Überproduktion eines Metaboliten zu erreichen, kann grundsätzlich von zwei verschiedenen Möglichkeiten Gebrauch gemacht werden:

1. Veränderungen der Fermentationsparameter zur Schaffung optimaler Bedingungen für die Synthese dieses Metaboliten;
2. Veränderungen in der genetischen Ausstattung des verwendeten Bakteriums.

Durch die kombinierte Anwendung dieser mikrobiologischen, verfahrenstechnischen und genetischen Techniken wurden bereits erhebliche Ausbeutesteigerungen bei der Fermentation durch Bakterien erzielt (Esser und Meinhardt 1984).

Seit einigen Jahrzehnten werden zur Stammverbesserung biotechnologisch relevanter Bakterien die klassischen Methoden der Mutation und Selektion sowie der Rekombination erfolgreich angewendet.

Die Selektion von Bakterienstämmen, deren genetisches Material durch Mutationen verändert worden ist, stellt eine der wesentlichsten Methoden der Stammverbesserung dar. Da die Häufigkeit des spontanen Auftretens solcher Mutationen relativ gering ist, setzt man zur Erzeugung genetisch veränderter Bakterien mutagene Agenzien (u.a. energiereiche Strahlung, chemische Mutagene; Übersicht bei Esser und Meinhardt 1984, Crueger und Crueger 1989) ein. Da es sich bei der induzierten Mutationsauslösung um einen ungerichteten Prozess handelt, ist die Entwicklung eines geeigneten Selektionssystems eine wesentliche Voraussetzung für den Erfolg dieser Stammverbesserungsmethode.

Neben der Mutation und Selektion stellt der Vorgang der Rekombination einen seit vielen Jahren genutzten Prozess in der Stammentwicklung dar. Voraussetzung für solche Rekombinationsprozesse ist die Bildung von Bakterienzellen mit Genomteilen unterschiedlicher Herkunft. Da den Bakterien die auf Eukaryonten beschränkten, sexuellen Prozesse der Karyogamie und Meiose fehlen, sind sie zur Erhaltung ihrer genetischen Variabilität auf die parasexuellen Vorgänge Konjugation, Transduktion und Transformation angewiesen (Übersichten bei Willetts 1988 (Konjugation), Margolin 1987 und Weisberg 1987 (Transduktion) und Hanahan 1987 (Transformation)). Der Vorteil in der Anwendung solcher Rekombinationsprozesse zur Stammverbesserung liegt darin, daß durch die Vereinigung von Allelen unterschiedlicher Herkunft in einem Stamm Bakterien mit neukombinierten Genen entstehen, die in vielen Fällen bessere Produktionseigenschaften aufweisen (Rehm 1980, Esser und Meinhardt 1984).

Eine weitere effiziente Möglichkeit der Herstellung *in vivo*-rekombinierter Bakterienstämme hat sich in den letzten Jahren durch die Entwicklung von Techniken zur Protoplastierung und Protoplastenfusion (insbesondere bei Gram-positiven Stämmen) ergeben (Übersicht bei Crueger 1988). Im Vergleich zur Konjugation, Transduktion und Transformation führt die Protoplastenfusion in der Regel zu einer wesentlich höheren Anzahl rekombinierter Stämme. Dies kann teilweise auf die meist vollständige Vereinigung der gesamten Genome zweier Ausgangszellen (teilweise auch unterschiedlicher Bakterienarten) in einer Fusionszelle zurückgeführt werden.

Mit der Entwicklung gentechnischer Methoden in den vergangenen fünfzehn Jahren sind die Möglichkeiten der Stammverbesserung industriell genutzter Bakterien stark erweitert worden. Gegenüber den klassischen Stammverbesserungstechniken weisen die gentechnischen Methoden zwei grundsätzliche Vorteile auf:

- (1) Im Gegensatz zu den weitgehend ungerichteten Vorgängen der Stammverbesserung durch Mutagenese und *in vivo*-Rekombination ermöglicht die Gentechnik eine gezielte Veränderung der genetischen Konstitution eines Bakteriums.
- (2) Mit Hilfe gentechnischer Methoden kann die genetische Schranke zwischen Prokaryoten und Eukaryoten überwunden werden. So ist es möglich, durch die Fermentation derart veränderter Bakterien auch artfremde, eukaryotische Proteine im industriellen Maßstab zu produzieren.

Eine gentechnische Bearbeitung eines Bakteriums setzt möglichst umfassende Kenntnisse seiner molekularen Organisation voraus. In den letzten Jahren sind eine Vielzahl von gentechnologischen Methoden entwickelt worden, um die molekularen "Baupläne" sowohl der prokaryotischen als auch der eukaryotischen Zelle zu analysieren.

Auf der Basis dieser Methoden ist es heute möglich, jedes gewünschte genetische Material einer Pro- oder Eukaryotenzelle nach seiner Isolierung durch Klonierung in einem (meist bakteriellen) Vektor zu vermehren, zu charakterisieren und *in vitro* zu modifizieren (Übersicht über Techniken der *in vitro*-Rekombination bei Maniatis et al. (1982), Glover (1985, 1987), Winnacker (1985) und Perbal (1988)). Die modifizierte DNA kann anschließend wieder in ihr ursprüngliches, prinzipiell jedoch auch in jedes fremde Genom eingeführt werden. Im Gegensatz zu den im *E.coli*-System durchführbaren Charakterisierungs- und Modifizierungsarbeiten müssen zur Einführung der DNA-Fragmente in den Zielorganismus spezifische Vektoren, DNA-Übertragungsmechanismen und Selektionssysteme entwickelt werden, die dem jeweiligen Wirtsorganismus angepaßt sind.

Diese in der Grundlagenforschung erzielten Fortschritte in der Analyse der Biosynthesewege, der Genorganisation und Genregula-

tion können anschließend für anwendungsbezogene Fragestellungen genutzt werden.

B) Entwicklung stabiler Wirts-/Vektorsysteme

Die Stammverbesserung biotechnologisch relevanter Bakterien beschränkt sich im wesentlichen auf die Entwicklung von Systemen, durch die die Überexpression eines meist heterologen Gens in diesem Bakterium ermöglicht wird. Die Überproduktion eines Proteins kann durch eine Erhöhung der Anzahl exprimierbarer Genkopien in der Zelle erreicht werden (Stark und Wahl 1984). Diese Genkopien können entweder auf einem frei replizierenden Vektor oder aber in der chromosomalen DNA lokalisiert sein.

Zur Integration von mehreren Genkopien in die chromosomale DNA können Genamplifikationsvorgänge, die in Bakterien spontan und teilweise mit hohen Frequenzen auftreten, genutzt werden (Übersicht: Stark und Wahl 1984). Gutterson und Koshland (1983) geben ein Beispiel, bei dem die gezielte Integration eines Plasmidvektors in einen anschließend stark amplifizierten Abschnitt der chromosomalen *E.coli* DNA zur Einführung von bis zu 30 Genkopien in das Genom führte. Dies ermöglichte eine Überexpression des in dem Vektor klonierten Gens.

Für Bakterien sind jedoch fast ausschließlich Expressionssysteme auf der Basis autonom-replizierender Hybridvektoren konstruiert worden. Diese ermöglichen die Etablierung vieler Kopien des zu exprimierenden Gens in der Wirtszelle, da die Vektoren unabhängig von der chromosomalen DNA replizieren können.

Im Gegensatz dazu basieren die Systeme für die Genexpression in eukaryotischen Mikroorganismen (z.B. den in vielen biotechnischen Verfahren verwendeten Hefenpilzen) in der Regel auf rekombinanten Vektoren, die in die chromosomale Wirts-DNA integriert werden (Übersicht bei Mohr 1989). Ein wesentlicher Grund für diese unterschiedlich konstruierten Wirt-/ Vektorsysteme bei Bakterien und Pilzen liegt darin, daß (mit Ausnahme der Hefen) für eukaryotische Mikroorganismen bislang nur wenige autonom-replizierende Vektorsysteme entwickelt werden konnten (Zusammenstellung bei Esser et al. 1986). Aufgrund der hohen Stabilität sowie der häufig zu beobachtenden, spontanen Integration vieler Vektorkopien in die chromosomale DNA (Mohr 1989) bieten sich jedoch gerade diese integrativen Vektorsysteme für viele Hefenpilze an.

Grundsätzlich lassen sich bei der Art des durch rekombinante Bakterien gebildeten Genprodukts zwei verschiedene Typen unterscheiden:

- (1) Peptid-Produkte, die als direktes Genprodukt des transkribierten und translatierten Gens synthetisiert werden; bei den meisten dieser Peptide handelt es sich um Produkte zur klinischen Anwendung.
- (2) Nicht-Peptid-Verbindungen, die das Produkt enzymatischer Reaktionen sind; die Katalyse dieser Reaktionen erfolgt durch die Enzyme, welche durch die klonierten Gene kodiert werden. Zu diesen Nicht-Peptidprodukten zählen hauptsächlich Aminosäuren, Vitamine (z.B. Riboflavin), Antibiotika und Nukleotide.

Viele der Nicht-Peptidprodukte können bereits seit längerer Zeit durch großtechnische Verfahren, die die natürlichen Syntheseleistungen der Bakterien ausnutzen, hergestellt werden (Rehm 1980, Präve et al. 1984).

Bei diesen Prozessen wird die Gentechnik zur Optimierung der Produktionsstämme eingesetzt; Stammverbesserungen können zu Ausbeutesteigerungen durch Erhöhung der Gendosis, durch Änderungen im Substanzspektrum und durch verbesserte Fermentationseigenschaften sowie zur Herstellung modifizierter Metaboliten führen (Crueger und Crueger 1989).

Dagegen ist die bakterielle Produktion der besonders für die medizinische Anwendung wichtigen Peptidprodukte erst nach Einführung gentechnischer Methoden möglich geworden.

Itakura et al. (1977) gelang erstmals die Expression eines eukaryotischen Gens in einem prokaryotischen Wirt: unter Verwendung eines synthetischen Gens wurde die Bildung des 14 Aminosäuren großen Peptidhormons Somatostatin in *Escherichia coli* nachgewiesen.

Pharmazeutisch interessante Peptide wie z.B. Insulin, Interleukine, Interferone und andere Wachstumsfaktoren sind in Säugerzellen nur in kleinsten Mengen vorhanden. Eine klinische Verwen-

Peptid	Funktion bzw. Verwendungszweck	Referenz
Somatostatin	Neurohormon	Itakura et al. 1977
Menschliches Wachstumshormon	Hormon des Längenwachstums	Goeddel et al. 1979a
Insulin	Blutzuckerregulierung	Goeddel et al. 1979b
Hepatitis-Virus-Antigene	Impfstoff	Charney et al. 1980 Edman et al. 1981
Interferon	Virusinfektion, Krebstherapie	Goeddel et al. 1980 Nagata et al. 1980
Haemagglutinin	Influenza-Impfstoff	Emtage et al. 1980 Heiland & Gething 1981
β -Endorphin	Opiat-Peptid	Shine et al. 1980 Ohysuye et al. 1983
Interleukin 2	T-Zellen-Wachstumsfaktor	Devos et al. 1983 Williams et al. 1988
t-PA (Plasminogen-aktivator)	Herzinfarkttherapie	Pennica et al. 1983
Erythropoietin	Hormon der Erythrozyten-Regulierung	Jacobs et al. 1985 Lin et al. 1985
Cu/Zn-, Mn-Superoxid-Dismutasen	Oxidoreduktasen, Anwendung in Krebstherapie	Hallewell et al. 1985 Hartmann et al. 1986 Beck et al. 1988

Tab. 1

Zusammenstellung pharmazeutisch interessanter, eukaryotischer Peptide, die mit Hilfe gentechnisch veränderter *Escherichia coli*-Zellen hergestellt wurden.

dung dieser Hormone und anderer, physiologisch aktiver Substanzen setzte bislang ihre aufwendige und kostspielige Isolierung aus tierischen Zellen voraus. Mit Hilfe bakterieller Expressionssysteme können diese Peptide in vergleichsweise großen Mengen zur Verfügung gestellt werden. Tab. 1 gibt einen Überblick über eine Reihe wichtiger Pharmaka, deren Überproduktion in gentechnisch veränderten *E.coli*-Zellen möglich ist.

Die Überproduktion eines eukaryotischen Peptides erfordert zunächst die Klonierung des entsprechenden Gens in einem Expressionsvektor. Ein typischer Vektor zur Genexpression in Bakterien ist in Abb. 1 schematisch dargestellt.

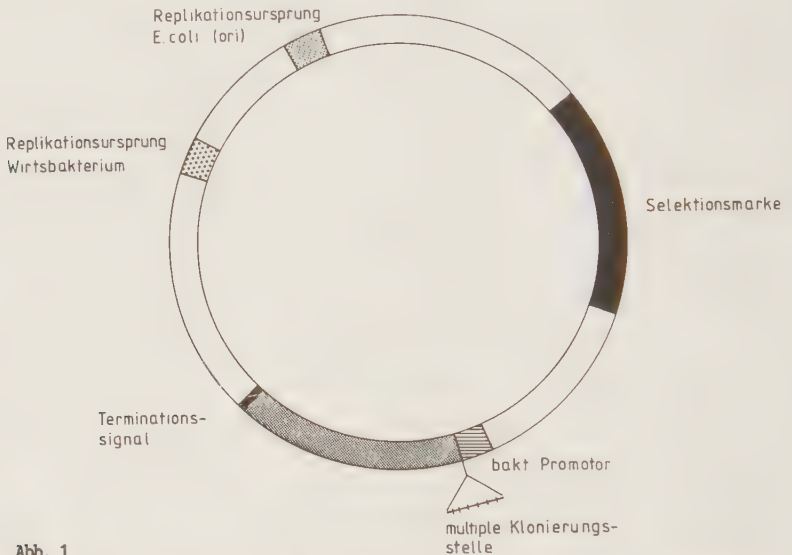


Abb. 1

Schematische Darstellung eines Expressionsvektors zur Genexpression in bakteriellen Wirten. Die Integration der heterologen Gensequenzen erfolgt in die stromabwärts eines bakteriellen Promotors liegende multiple Klonierungsstelle. Die Transkription des Gens wird durch die hinter dem Gen klonierten Terminator-Bereiche beendet. Wirts-spezifische Replikationsursprungs-Sequenzen ermöglichen eine Etablierung des Vektors in *E.coli* und dem Wirtsbakterium. Die erfolgreiche Einführung des Vektors kann durch eine Selektion auf die Vektor-kodierte Selektionsmarke erfolgen.

Um die für das gewünschte Genprodukt kodierende DNA-Sequenz zu erhalten, können verschiedene Strategien angewendet werden:

- (1) Eine direkte Klonierung des gewünschten Gens erfordert eine DNA-Sonde (d.h. einen meist heterologen DNA-Abschnitt, dessen Basensequenz eine große Ähnlichkeit zu der des gewünschten Gens aufweist). Durch DNA-DNA-Hybridisierungen läßt sich das Gen aus einer genomischen Genbank des entsprechenden Organismus isolieren.

- (2) Die diskontinuierliche Organisation vieler eukaryotischer Gene (kodierende Exon-Bereiche werden durch nicht-kodierende Intron-Bereiche unterbrochen (Gilbert 1978)) erfordert den indirekten Weg der cDNA-Klonierung.

Das Prinzip dieser Klonierungsstrategie besteht in der Isolierung reifer mRNA, die keine Intron-spezifischen Sequenzen mehr enthält, aus der eukaryotischen Zelle. Durch *in vitro* DNA-Techniken wird die mRNA-Matrize in zunächst einzelsträngige, später dann in doppelsträngige cDNA ("copy"-DNA) umgeschrieben. Abschließend erfolgt die Klonierung dieser nun kontinuierlichen Gensequenz in entsprechende Vektoren. Die gewünschten, rekombinanten Klone können in vielen Fällen durch immunologische Nachweisverfahren identifiziert werden (Übersicht über cDNA-Techniken bei Winnacker 1985). Zu den ersten Beispielen solcher cDNA-Klonierungen zur Überproduktion pharmazeutisch relevanter Peptide zählen die Gene für das Ratteninsulin (Villa-Komaroff et al. 1978), das menschliche Wachstumshormon (Martial et al. 1979) und für Antigene des Maul- und Klauenseuchevirus (Küpper et al. 1981).

- (3) Eine weitere Möglichkeit stellt die Herstellung synthetischer Gene dar. Die Gensynthese setzt jedoch die vorherige Bestimmung der Aminosäuresequenz des entsprechenden Genproduktes voraus.

Ein wesentlicher Vorteil dieses chemischen Gensynthese-Verfahrens beruht darauf, daß für 18 der 20 bei der Proteinbiosynthese verwendeten Aminosäuren synonyme Codons existieren. Diese Variabilität ermöglicht u.a. das gezielte Einfügen von Restriktionsschnittstellen in die Gensequenz sowie eine Optimierung des Codongebrauches, der für die effiziente Expression der Gene von großer Bedeutung ist (Grosjean und Fiers 1982). Das Interferon-Gen (Windass et al. 1982), das Gen für humanes Proinsulin (Brousseau et al. 1982) und das β -neo-Endorphin-Gen (Ohsuye et al. 1983) sind Beispiele für die Verwendung synthetischer Gene zur Überexpression in Bakterien.

1. Entwicklung stabiler Expressionsvektoren

Die Entwicklung stabiler Wirt-/Vektorsysteme ist wesentliche Voraussetzung für die Überexpression heterologer Gene in Bakterien. Neben der Bereitstellung geeigneter Wirtsstämme ist die Konstruktion stabil replizierender Vektoren, die zudem eine möglichst kontrollierte Genexpression gewährleisten, erforderlich.

a) Regulation der Genexpression

Die Expression eines klonierten eukaryotischen Gens in einem bakteriellen Wirt erfordert die Gegenwart verschiedener prokaryotischer Funktionselemente, die die Transkription des Gens und die nachfolgende Translation der mRNA in die Aminosäuresequenz regulieren:

- (1) Einen Promotorbereich, bestehend aus den Bindestellen für RNA-Polymerase (- 10 Region), Sigma-Faktor (-35 Region) und regulatorische Proteine sowie Transkriptionsstart-Stelle (Übersicht bei McClure 1985, Reznikoff et al. 1985);
- (2) Terminatoren der Transkription (Holmes et al. 1983);
- (3) Translationssignale, bestehend aus der Ribosomen-Bindestelle (Shine-Dalgarno-Sequenz) sowie Start- und Stopcodon (Gold et al. 1981).

Eine Übersicht über Struktur und artspezifische Besonderheiten prokaryotischer Promotoren und Translationssignale findet man bei Winnacker (1985).

Bei den zu Beginn der 80iger Jahren entwickelten Systemen zur Expression heterologer Gene in *Escherichia coli* handelte es sich weitgehend um konstitutive Expressionssysteme.

Auf der Basis hochreplizierender, in *E.coli* natürlich vorkommender Plasmide (wie z.B. ColE1) und unter Verwendung der *E.coli lac*- bzw. *trp*-Operon-Promotoren wurden eine Vielzahl von Expressionsvektoren konstruiert, mit denen eine Anreicherung des rekombinanten Proteins bis zu 5 % der Gesamt-Proteinmenge der Wirtszelle möglich ist (Pennica et al. 1983, Emtage et al. 1983).

Die Kontrolle der Transkription sollte aufgrund der Struktur der Promotoren, die aus metabolisch regulierbaren Genen stammten, durch Änderungen im Nährstoffangebot erfolgen. Es stellte sich jedoch heraus, daß die meisten dieser Systeme unter Verwendung hochreplizierender Vektoren nicht regulierbar waren, sondern zu einer konstitutiven Überexpression führten (Caulcott et al. 1985).

Der wesentliche Grund für die konstitutive Transkription der stromabwärts der ursprünglich regulierbaren Promotoren liegenden Gene dürfte in der mangelnden Synthese von Repressormolekülen liegen. Diese Repressorproteine, die durch einzelne Genkopien kodiert werden und den jeweiligen Promotor kontrollieren, werden in den meisten dieser Systeme nicht in einem für viele Promotor-/Genkopien ausreichendem Maße gebildet (Caulcott und Rhodes 1986).

Diese unkontrollierte Genexpression führt in vielen Fällen jedoch dazu, daß in Abwesenheit eines Selektionsdruckes die Expressionsvektoren instabil werden (Imanaka et al. 1980, Skogman et al. 1983). Aufgrund des Wuchsvorteils plasmidfreier gegenüber plasmidtragenden *E.coli*-Zellen (Caulcott et al. 1985) werden daher bei Fermentationen die Bakterienzellen, die das rekombinante Protein bilden, schnell überwachsen.

Die Zugabe von Antibiotika erlaubt meist eine Selektion auf solche Zellen, die den Expressionsvektor mit einer von ihm determinierten, entsprechenden Antibiotika-Resistenz besitzen (Welmsley et al. 1983). Ein solches System eignet sich jedoch aus ökonomischen Gründen und der Notwendigkeit zusätzlicher Aufreinigungsschritte bei der nachfolgenden Produktisolierung nicht für großtechnische Anwendungen.

Diese mit konstitutiven Expressionssystemen erhaltenen Erfahrungen führten zur Konstruktion von Expressionsvektoren, die eine effiziente Regulierung der Gentranskription ermöglichen. Die Kontrolle der Transkription des heterologen Gens erfolgt bei diesen Systemen nicht mehr durch Promotoren aus metabolisch regulierten Genen, sondern durch temperatursensitive Repressor-/Promotor-Kombinationen.

Zu den in den meisten *E.coli*-Systemen verwendeten, durch die Temperatur regulierten Repressor-/Promotor-Einheiten zählen die p_L - und p_R -Promotoren des Bakteriophagen *Lambda*. Diese beiden Promotoren werden durch das temperatursensitive Repressorprotein, das von dem *Lambda*-Gen *cI857* determiniert wird, kontrolliert. Die Denaturierung des *cI857*-Genprodukts bei Temperaturen über 37°C führt zur Aktivierung der p_L - und p_R -Promotoren, wodurch die Transkription des stromabwärts dieser Regionen liegenden Gens ermöglicht wird.

Die Transkription des heterologen Gens wird unter Verwendung solcher Vektoren erst durch die Erhöhung der Fermentationstempe-

ratur initiiert. Aufgrund der höheren Stabilität des rekombinanten Plasmids, die aus dieser regulierbaren Genexpression resultiert, werden Überproduktionen des heterologen Genprodukts von bis zu 25 % der Gesamtproteinmenge der Wirtszelle innerhalb weniger Stunden möglich (Simons et al. 1984).

Das für die Bildung des temperatursensitiven Repressormoleküls verantwortliche Gen kann dabei z.B. im Falle der *Lambda p_L-p_R*-Promotoren entweder in dem Expressionsvektor selbst (Simons et al. 1984), in einem weiteren in der Zelle vorhandenen Vektor (Buell et al. 1985) oder in der chromosomalen DNA der Wirtszelle (Gross et al. 1985) integriert werden.

Neben der beschriebenen Regulation der Genexpression durch die Konstruktion von Vektoren mit positiv oder negativ kontrollierten Promotoren sind eine Reihe weiterer Regulationssysteme von zunehmender Bedeutung. Zu diesen neueren Entwicklungen gehören die Einbeziehung des (mit dem Translationsprozeß verbundenen) Vorgangs der Attenuation (Kolter und Yanofsky 1982) sowie vor allem die Regulation durch "antisense"-RNA (Simons und Kleckner 1988).

Die Analyse der Transkriptions- und Translations-Signalsequenzen in anderen Bakterien als *Escherichia coli* hat gezeigt, daß sich die Expressionssysteme verschiedener Gram-negativer sowie Gram-positiver Bakterien nicht grundsätzlich voneinander unterscheiden (Übersicht bei Imanaka 1986). Zum Teil existieren jedoch artspezifische Besonderheiten, die bei der Entwicklung von Genexpressionssystemen berücksichtigt werden müssen.

Als Beispiel für solche artspezifischen Unterschiede bei der Transkriptions- und Translationsregulation sei hier das *Bacillus subtilis*-System genannt, das sich u.a. durch das Vorkommen zusätzlicher Sigma-Faktoren (Doi und Wang 1986) sowie anders strukturierter Ribosomen-Bindungsstellen von dem *E.coli*-System unterscheidet. Aus diesem Grund werden viele aus *E.coli* stammende Gene nicht in *B.subtilis* exprimiert (Zaghloul et al. 1985), während *Bacillus*-Promotoren in der Regel in *E.coli* erkannt werden.

Daher ist die Konstruktion von Expressionsvektoren mit wirtsspezifischen Transkriptions- und Translations-Signaleinheiten eine wesentliche Voraussetzung für die optimale Überexpression eines rekombinanten Gens.

b) Stabile Replikation der Expressionsvektoren

Eine effiziente Überproduktion eines heterologen Proteines im Verlauf eines Fermentationsprozesses erfordert die ständige Gegenwart des entsprechenden Expressionsvektors in den Wirtszellen. Bei der Art der häufig auftretenden Plasmid-Instabilität kann grundsätzlich zwischen zwei verschiedenen Formen unterschieden werden: Neben der strukturellen Instabilität, auf die in Abschnitt 2b näher eingegangen wird, ist die Instabilität durch Plasmid-Segregation von großer Bedeutung. Diese ist die Folge einer ungleichmäßigen Verteilung ("Partition") der einzelnen Plasmidkopien während der Zellteilung, die dazu führt, daß eine der beiden Tochterzellen keine Plasmidkopie erhält.

Aufgrund des häufig zu beobachtenden Wuchsvorteils der plasmidlosen Bakterienzellen führen solche Segregationsinstabilitäten häufig zu einem totalen Verlust der plasmidtragenden Zellen im Verlaufe eines Fermentationsprozesses (Fredrickson 1977).

Um den Anteil der plasmidlosen Zellen in einer Fermentationskultur möglichst klein zu halten, sind eine Vielzahl unterschiedlicher Systeme entwickelt worden. Eine Möglichkeit stellt die ständige Selektion auf plasmidtragende Zellen dar.

Neben der bereits beschriebenen Selektion durch Zugabe von Antibiotika, gegenüber denen plasmidtragende Zellen eine Resistenz aufweisen, sind u.a. Systeme auf der Basis von Vektoren entwickelt worden, die die Bildung von Bacteriocinen determinieren. Bei diesen Bacteriocinen handelt es sich um Proteine, die auf andere, plasmidfreie Zellen des gleichen Wirtes abtötend wirken. Die auf diesen Vektoren enthaltenen Resistenzgene verhindern die Selbsttötung (Literatur bei Lauffenburger 1987).

Eine positive Selektion auf plasmidtragende Zellen erlaubt die (z.B. von Imanaka et al. 1980 vorgestellte) Verwendung von Mutanten, welche die

Fähigkeit zur Metabolisierung eines essentiellen Nährstoffes verloren haben. Aufgrund der Möglichkeit der Komplementation dieser Mutation durch andere Zellen sowie der erforderlichen Verwendung von Minimalmedien hat sich eine solche Vorgehensweise für die Anwendung in industriellen Prozessen jedoch nicht durchsetzen können.

Aufgrund der mit diesen Selektionsverfahren verbundenen Schwierigkeiten wird seit einiger Zeit der Schwerpunkt auf die Entwicklung von Expressionsvektoren mit modifizierten Replikations- und Partitionsmechanismen gelegt.

Die Konstruktion von Replikationsursprüngen, deren Aktivität durch die Temperatur reguliert wird, stellt dabei eine Möglichkeit dar, die Anzahl der Genkopien pro Zelle durch die kontrollierte Steigerung der Replikation des Vektors zu erhöhen (Caulcott et al. 1985).

Auf der Basis des bereits vorgestellten, temperatursensitiven *Lambda* Repressor-/Promotorsystems sind Vektoren entwickelt worden, die durch Erhöhung der Fermentationstemperatur über 37°C sehr stark amplifiziert werden (Larsen et al. 1984). Die niedrige Kopienzahl vor diesem Induktionsschritt verhindert eine starke Überproduktion des rekombinanten Proteines, welche in vielen Fällen die Plasmidstabilität negativ beeinflusst (Vehmaanperä und Korhola 1986).

Yarranton et al. (1984) und Caulcott et al. (1985) beschreiben die Entwicklung ähnlicher Expressionsvektoren, bei denen die Replikation durch zwei, teilweise regulierbare Initiationseinheiten hervorgerufen wird, die zu unterschiedlich hohen Kopiezahlen führen.

Eine andere Vorgehensweise basiert auf der Entwicklung von Expressionsvektoren, welche DNA-Abschnitte (*par*-Locus) aus natürlich vorkommenden Plasmiden enthalten, die bei der Teilung der Bakterienzelle eine geordnete Verteilung der einzelnen Vektorkopien auf die entstehenden Tochterzellen ermöglichen. Teilweise wird die effiziente Plasmid-Stabilisierung durch ein von diesem *par*-Genlocus vermitteltes Abtöten Plasmid-freier Zellen erreicht (Übersicht: Gerdes 1988).

Natürlich vorkommende Plasmide zeichnen sich in den meisten Fällen trotz einer niedrigen Kopiezahl und ohne erkennbaren Selektionsvorteil für die Wirtszelle durch eine extrem hohe Stabilität aus. Die fehlende Plasmid-

segregation beruht in diesen Fällen auf einem spezifischen Partitionsmechanismus, der von diesen Plasmiden kodiert wird und die gleichmäßige Verteilung der Vektorkopien auf die Tochterzellen gewährleistet (Tucker et al. 1984, Imanaka et al. 1984, Gerdes et al. 1985, Mori et al. 1986).

Diese *par*-Genbereiche sind bei der Entwicklung vieler Expressionsvektoren zumeist unbeabsichtigt entfernt worden. Während Vektoren mit hohen Kopiezahl auf einen funktionsfähigen Partitionsmechanismus nicht unbedingt angewiesen sind, ist dieser für den stabilen Erhalt von Expressionsvektoren mit niedriger Kopiezahl unerlässlich (Summers und Sherratt 1984).

Durch Klonierung des *par*-Locus aus Plasmiden mit niedriger Kopiezahl konnte zudem die Stabilität rekombinanter Vektoren mit hoher Kopiezahl weiter gesteigert werden (Skogman et al. 1983, Austin et al. 1986).

2. Entwicklung geeigneter Wirtsstämme für die Genexpression

Die Überproduktion eines rekombinanten Proteines in einem bakteriellen Expressionssystem erfordert neben der beschriebenen Vektorkonstruktion die Entwicklung eines geeigneten Wirtstammes. Als Voraussetzung für eine stabile Genüberexpression ist nur der Einsatz von Bakterienstämmen sinnvoll, die weder die heterologen DNA-Gensequenzen noch das von diesen determinierte, rekombinante Genprodukt degradieren.

Für das eingehend untersuchte, Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* sind eine Reihe von Genen und Proteinen identifiziert worden, die auf die strukturelle Stabilität von DNA-Sequenzen und heterologen Proteinen einen wesentlichen Einfluß haben. Tabelle 2 faßt einige wichtige Gene zusammen, die für die Entwicklung stabiler Wirt-/Vektorsysteme von großer Bedeutung sind.

	Gen	Genprodukt	positive Auswirkung der jeweiligen Defekt-Mutation
Restriktion/ Modifikation	hsdM	EcoK-Restriktionsenzym, modifizierende Untereinheit	keine Modifikation heterologer DNA Sequenzen
	hsdR	EcoK-Restriktionsenzym, katalytische Untereinheit	Modifikation heterologer DNA Seq. durch hsdM-Methylase: keine Degradierung klonierter DNA
Stabilität der DNA Sequenzen	recA	Rekombinase, spezifische Protease	Stabilisierung klonierter DNA Seq./ Verhinderung homologer Rekombinationsvorgänge
	recB, recC recD	Strukturgene für Exonuklease V	Stabilisierung klonierter, palindromischer DNA Sequenzen in Verbindung mit sbcB-Mutation
	sbcB	Strukturgen für Exonuklease I	Stabilisierung klonierter, palindromischer DNA Sequenzen in Verbindung mit recBCD-Mutationen
Stabilität der mRNA/ Proteine	pnp	Strukturgen für Polynukleotid-phosphorylase	gesteigerte Stabilität bestimmter eukaryotischer mRNAs; gesteigerte Expression eukaryotischer Gene
	htpR	Strukturgen für Sigma-Faktor (Kontrolle der Hitzeschockgene)	gesteigerte Stabilität verschiedener Proteine
	lon	Strukturgen der Lon-Protease	gesteigerte Stabilität bestimmter Fusionsproteine

Tab. 2

Zusammenstellung einer Reihe von *E.coli*-Genen, die für die Stabilität heterologer DNA-Sequenzen und der von ihnen kodierten Proteine von Bedeutung sind. Mutationen in diesen Genen besitzen die angegebenen positiven Auswirkungen auf die Stabilität der in solche Wirtsstämme eingeführten DNA-Sequenzen. Abkürzung der Genbezeichnungen nach Bachmann und Low (1980).

a) Restriktion und Modifikation heterologer DNA-Sequenzen

Nach der Einführung unmodifizierter, heterologer DNA-Fragmente in *E.coli* K-12 Zellen werden diese DNA-Sequenzen durch die EcoK-Restriktionsendonuklease degradiert. Dieses Restriktions- und Modifikationssystem besteht aus drei Untereinheiten, die von den

Genen *hsdR* (katalytische Untereinheit der Endonuklease), *hsdM* (modifizierende Untereinheit) und *hsdS* (wirtsspezifische Untereinheit) determiniert werden (Sain und Murray 1980).

Die spezifische Methylierung bestimmter Basen durch die modifizierende Untereinheit dieses Restriktionsenzym verhindert, daß die wirtseigenen DNA-Sequenzen durch die endonukleolytische Aktivität der katalytischen Untereinheit des Enzyms abgebaut werden. Mittlerweile sind bei einer Vielzahl von Bakterienarten ähnliche Restriktions-/Modifikationssysteme analysiert worden; für die gentechnologische *in vitro* Anwendung stehen bereits über 700 dieser isolierten Restriktionsenzyme zur Verfügung (Kessler und Hölte 1986).

Durch die Konstruktion von *E.coli*-Stämmen, deren *hsdR*-, *hsdM*- und *hsdS*-Gene durch Mutationen inaktiviert worden sind, können zusätzlich in die Zelle eingeführte, heterologe DNA-Fragmente nicht mehr restringiert bzw. modifiziert werden.

Die meisten der vielfach eingesetzten Transformationsstämme wie z.B. HB101 (Boyer und Roulland-Dussoix 1969), DH1 (Hanahan 1983) und JM103 (Messing et al. 1981) besitzen Mutationen in ihren *hsdR*- bzw. *hsdS*-Genen.

DNA-Klonierungen werden häufig in restriktionsdefekten (*hsdR*⁻), aber modifikationsfähigen (*hsdM*⁺) *E.coli*-Stämmen vorgenommen. Die in diesen Stämmen replikativ vermehrte, heterologe DNA wird entsprechend methyliert und kann anschließend nach Übertragung in *hsdR*⁺ *hsdM*⁺ Stämme in diesen nicht mehr restringiert werden (Übersicht bei Kushner 1987).

Aus sicherheitstechnischer Sicht kann eine solche Vorgehensweise bei der Verwendung gentechnisch modifizierter Bakterien von Interesse sein, da solche *hsdR*⁺ Produktionsstämme auch bei einer möglichen Freisetzung fremde DNA durch Restriktion degradieren könnten.

Neben dieser mit dem Restriktionsapparat der *E.coli*-Zelle verbundenen Methylase sind weitere DNA-modifizierende Enzyme bekannt (z.B. DNA-Adenosin-Methylase (*dam*), Geier und Modrich 1979).

Durch die Verwendung von *E.coli dam*-Mutanten wird z.B. die Methylierung von BclI-Restriktionserkennungsstellen in rekombinanten DNA-Fragmenten verhindert (Dreiseikelman et al. 1979). Auf diese Weise können daher zusätzliche Restriktionsschnittstellen für die *in vitro*-Manipulation der DNA-Sequenzen zugänglich gemacht werden (Beispiel für eine solche Anwendung in Meinhardt 1987).

Zusammengefaßt ist die Analyse des Restriktions- und Modifikationsapparates der jeweiligen Bakterienart und die gegebenenfalls vorzunehmende Inaktivierung dieser Funktionen eine wesentliche Vorbedingung zur stabilen Etablierung heterologer Gensequenzen in einem bakteriellen Wirt.

b) Strukturelle DNA-Instabilität durch Rekombination

Neben der Instabilität eines rekombinanten Genes in einem bakteriellen Wirts-/Vektorsystem durch Segregation des Expressionsvektors ist die strukturelle Instabilität dieser DNA-Sequenzen von Bedeutung. Diese äußert sich in Form von Deletionen, Insertionen und Umordnungen der klonierten DNA-Fragmente (Mizukami et al. 1986), teilweise jedoch auch der chromosomalen DNA (Stark und Wahl 1984).

Einer besonders stark ausgeprägten, strukturellen Instabilität sind im allgemeinen rekombinante Plasmide in Gram-positiven Bakterien unterworfen: neben den Streptomyceten ist vor allem bei Vertretern der Gattung *Bacillus* eine hohe genetische Instabilität beschrieben (Uhlen et al. 1981, Lopez et al. 1984, Hahn und Dubnau 1985).

Das Auftreten struktureller Instabilität scheint nach den bisherigen Erkenntnissen im wesentlichen durch Rekombinationsvorgänge zwischen homologen DNA-Sequenzen in der Bakterienzelle hervorgerufen zu werden. Aus diesem Grund sind in den letzten Jahren verstärkt Anstrengungen unternommen worden, die genetischen Grundlagen des Vorgangs der homologen Rekombination in Bakterien zu analysieren. Als Schlüsselenzym dieser Rekombinationsmechanismen konnte in *E.coli* das *recA*-Genprodukt identifiziert werden (Übersicht bei Cox und Lehman 1987).

Das *E.coli* RecA-Protein ist ein multifunktionales Enzym, das in eine Vielzahl essentieller Prozesse der Bakterienzelle verwickelt ist: Genetische und biochemische Studien haben gezeigt, daß das *E.coli* RecA-Protein bei den Vorgängen der homologen Rekombination (Clark 1973, Radding 1981 und 1982) sowie bei den DNA-Reparaturmechanismen der Bakterienzelle (Walker 1984) eine Schlüsselfunktion besitzt. Zusätzlich wurde eine Beteiligung des RecA-Proteins an der Initiation stabiler DNA-Replikation gezeigt (Kogoma et al. 1985).

In vitro konnte nachgewiesen werden, daß das gereinigte RecA-Protein eine DNA-abhängige ATPase-Aktivität besitzt und die Basenpaarung zwischen einem DNA-Einzelstrang und einer komplementären, superhelikalen Doppelstrang-DNA katalysiert (McEntee et al. 1979, Shibata et al. 1979, West et al. 1980). Durch den Einbau dieses Einzelstrangs in den Doppelstrang wird der ursprüngliche, komplementäre DNA-Strang verdrängt (D-Schleifen-Bildung). Zusätzlich zu dieser strukturellen und katalytischen Rolle bei der Initiation homologer Rekombinationsvorgänge besitzt das RecA-Genprodukt eine Schlüsselfunktion bei der Reparatur geschädigter DNA-Sequenzen: das durch DNA-Schäden aktivierte RecA-Protein induziert die autokatalytische Spaltung des LexA-Proteins (Little 1984). Dieses Protein ist der Repressor einer Vielzahl von SOS-Genen, die für unterschiedliche DNA-Reparaturmechanismen kodieren. Durch Spaltung des Repressors wird die Transkription dieser Gene ermöglicht (SOS-Antwort, Übersicht bei Walker 1984).

Die Analyse von *E.coli* *recA*-Mutanten (Clark und Marquilies 1965) zeigte, daß Mutationen dieses Gens homologe Rekombinationsereignisse nahezu vollständig unterdrücken (Clark 1973). Solche rekombinationsdefizienten *E.coli*-Stämme eignen sich daher besonders zur Klonierung von repetitiven und palindromischen DNA-Sequenzen (Brutlag et al. 1977).

Die meisten der in gentechnischen Transformationsexperimenten eingesetzten *E.coli*-Stämme weisen einen Defekt in ihrem *recA*-Gen auf (Zusammenstellung bei Maniatis et al. 1982). Dies ist besonders bei der Anlage von Plasmid- bzw. Cosmid-Genbanken von Bedeutung (methodische Übersicht bei Winnacker 1985).

Um das Auftreten struktureller Instabilitäten zu reduzieren, werden auch in vielen Wirt-/Vektorsystemen zur Überexpression heterologer Gene *E.coli*-Stämme eingesetzt, deren *recA*-Gen inaktiviert worden ist (Übersicht über häufig verwendete *E.coli*-Stämme zur Genexpression bei Marston 1987). Durch die Verwendung solcher rekombinationsdefekten Mutanten kann in vielen Expressionssystemen die Instabilität der klonierten DNA-Sequenzen aufgehoben werden, wodurch effiziente Proteinproduktionen möglich sind.

Reid et al. (1986) geben ein eindrucksvolles Beispiel für die Stammverbesserung eines *Bacillus subtilis*-Stammes durch das Einfügen einer Mutation in das *recE*-Gen. Dieses kodiert für ein Protein, das dem *E.coli* RecA-Genprodukt analog ist (Lovett und Roberts 1985). Der zur Expression eines Proteasegenes eingesetzte Vektor zeigte ohne Selektionsdruck im *rec'* Stamm eine hohe Instabilität (99% der Zellen verloren den Vektor nach 30 Generationen), während er in der entsprechenden *rec-* Mutante sehr stabil war; lediglich 4% der Zellen trugen den Vektor nach 60 Generationen nicht mehr.

Neben der Stabilisierung klonierter Sequenzen wird in *recA*-negativen *E.coli*-Zellen auch die durch Amplifikationen chromosomaler DNA-Abschnitte hervorgerufene, strukturelle Instabilität reduziert (Übersicht bei Stark und Wahl 1984).

In den letzten Jahren ist zunehmend auch bei anderen Bakterien-gattungen nach dem Vorkommen von Proteinen gesucht worden, die eine ähnliche Funktion wie das *E.coli* RecA-Protein besitzen. Aus einer Reihe verschiedener sowohl Gram-negativer als auch Gram-positiver Bakterien wurden solche *recA*-ähnlichen Gene isoliert (s. V. Diskussion, Tab. 6). In fast allen Fällen sind die von diesen *recA*-ähnlichen Genen kodierten Proteine in der Lage, *recA*-Mutationen in *Escherichia coli* zu komplementieren.

Durch die in Tab. 3 angegebenen *in vitro*-Techniken sind bereits einige dieser Gene inaktiviert worden. Diese Konstrukte wurden anschließend zum Austausch der nativen Genkopie des jeweiligen Bakteriums verwendet (s. Kapitel V. Diskussion).

Die so hergestellten Mutanten sind UV-sensitiv und in allen untersuchten Fällen rekombinationsnegativ. Dies ermöglicht ihren Einsatz sowohl als Wirtsstämme für die molekulare Charakterisierung des jeweiligen Bakteriums als auch für biotechnologische Produktionsprozesse.

Bakterium	Art der Inaktivierung	DNA-Transfer	UV-Resist. Verhalten	Rekombination	Referenz
<i>Aeromonas caviae</i>	Tn5-Insertion	Transduktion	sensitiv	n.b.	Resnick & Nelson 1988
<i>Erwinia carotovora</i>	Tn5-Insertion	Transformation	"	n.b.	Zink et al. 1985
<i>Methylobacterium clausii</i>	Markerinsertion	Konjugative Mobilisierung	"	n.b.	diese Arbeit
<i>Neisseria gonorrhoea</i>	Deletion, Markerinsertion	Transformation	"	-	Koomey & Falkow 1987
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Mutagenese	Chromosomen-Mobilisierung	"	-	Früh et al. 1983
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tn1-/Tn501-Insertion	Transduktion	"	-	Ohman et al. 1985
<i>Vibrio cholerae</i>	4 bp-Insertion	Konjugative Mobilisierung	"	-	Goldberg & Mekanlanos 1986

Tab. 3

Zusammenstellung der bisher durch gentechnische Methoden konstruierten *recA*-negativen Bakterienstämme.

Die jeweiligen *recA*-Gene sind in der angegebenen Weise entweder *in vitro* oder durch Transposonintegrationen (in einem *E.coli*-System) inaktiviert worden. Die Einführung der inaktivierten Genkopie in den Ausgangsstamm erfolgte bei diesen Systemen unter Verwendung der bakteriellen DNA-Übertragungsmechanismen Transformation, Transduktion und Konjugation. Die hergestellten *recA*-Mutanten weisen eine stark erhöhte Sensibilität gegenüber UV-Strahlung auf. Soweit bestimmt, sind die Mutanten rekombinationsdefizient (n.b. = nicht bestimmt; - = negativ).

Bei *Escherichia coli* sind neben dem RecA-Protein weitere Enzyme identifiziert worden, die an homologen Rekombinationsvorgängen beteiligt sind. Von Bedeutung sind dabei besonders die vom *sbcB*-Gen kodierte Exonuklease I und die aus drei Untereinheiten zusammengesetzte Exonuklease V (*recBCD*-Exonuklease). Einen Überblick über die Funktionsweise dieser Enzyme, die vor allem palindromische Sequenzen stabilisieren (Leach und Stahl 1983, Nader et al. 1985, Wyman et al. 1985), geben Cox und Lehman (1987).

c) Instabilität der rekombinanten Genprodukte

Bei der Produktion heterologer Proteine in Bakterien ist die Degradierung des Genproduktes durch Proteasen des Wirtsbakteriums ein häufig zu beobachtendes Problem (Talmagde und Gilbert 1982, Goff und Goldberg 1985, Kitano et al. 1987). Um die Stabilität der gebildeten rekombinanten Proteine zu erhöhen, sind in der letzten Zeit eine Reihe unterschiedlicher Strategien entwickelt worden, die im folgenden vorgestellt werden.

Zur Synthese intrazellulär lokalisierter, heterologer Proteine stehen grundsätzlich zwei verschiedene Vorgehensweisen zur Verfügung: Neben der direkten Expression des gewünschten Genes kann durch Klonierung der Gensequenz in den kodierenden Leserahmen einer synthetischen oder bakteriellen Sequenz ein wesentlich stabileres Fusionsprotein hergestellt werden.

Die Konstruktion solcher, aus bakteriellen und eukaryotischen Anteilen bestehender Fusionsgene ist besonders zur Überproduktion kleinerer, eukaryotischer Polypeptide von Vorteil: Itakura et al. (1977), Goeddel et al. (1979b) und Shine et al. (1980) zeigten bereits sehr früh, daß Fusionsproteine einer deutlich geringeren Degradierung durch das bakterielle Proteasesystem unterliegen.

Bei der Herstellung von Fusionsproteinen muß allerdings berücksichtigt werden, daß für viele Anwendungen des rekombinanten Genproduktes die Trennung des eukaryotischen vom bakteriellen Anteil des Fusionsproteins erforderlich ist.

Zur Spaltung dieser unterschiedlichen Proteinanteile sind eine Reihe von chemischen und enzymatischen Verfahren entwickelt worden (Zusammenstellung bei Marston 1987).

Eine Möglichkeit der Stabilisierung heterologer Proteine stellt die Entwicklung von bakteriellen Wirtsstämmen dar, bei denen spezielle Proteaseaktivitäten weitgehend reduziert sind. Zu den bisher analysierten Proteasen, die heterologe Proteine degradie-

ren, zählt die durch das *lon*-Gen kodierte La-Protease (Chung und Goldberg 1981). Durch die Verwendung von *lon⁻* Mutanten wurde in einigen Fällen die Degradierung der rekombinanten Proteine stark eingeschränkt (Gottesman et al. 1981, Young und Davis 1983, Buell et al. 1985, Maurizi et al. 1985).

Greenberg et al. (1988) geben ein weiteres Beispiel für die Bedeutung eines optimierten Wirtsstammes für die stabile Genexpression: Allein durch die Verwendung eines *lon⁻* Protease-defizienten *E.coli*-Stammes wurde die Ausbeute an dem rekombinanten Genprodukt Interleukin-3 um das 3- bis 5-fache erhöht.

Neben dem *lon*-Gen sind weitere Genorte beschrieben worden, deren Genprodukte einen Einfluß auf die proteolytische Degradierung der rekombinanten Proteine haben.

Baker et al. (1984) und Goff et al. (1984) haben z.B. die Wirkung des *htpR*-Genes, das die Hitzeschockgene reguliert, auf die Proteindegredierung beschrieben.

Von zunehmender Bedeutung ist die Durchführung von Modifizierungen in den 5'-Bereichen der Gensequenzen; durch Veränderung der Basensequenz (z.T. durch Einfügen von bestimmten homo-Oligonukleotiden) werden Proteine mit einem modifizierten, aminoterminalen Teil hergestellt, der keine Angriffspunkte mehr für die Sequenz-spezifisch wirkenden, wirtseigenen Proteasen darstellt (Sung et al. 1986).

Die Überexpression heterologer Gene in *E.coli* führt häufig zu einer Akkumulierung des rekombinanten Proteins bis zu 25% der gesamten Proteinmenge der Wirtszelle. Ein in vielen Fällen beobachtetes Phänomen ist bei solchen Überproduktionen die Unlöslichkeit dieser Proteine (Marston 1987). Zusammen mit weiteren bakteriellen Proteinen bildet das rekombinante Produkt intrazelluläre Aggregate (sog. "inclusion bodies") im Zytoplasma des Wirtsbakteriums. Diese Aggregatbildung ist nicht nur auf heterologe Proteine wie z.B. humanes Proinsulin (Williams et al. 1982) und

Prochymosin (Schoemaker et al. 1985) beschränkt, sondern kann auch bei der Überexpression homologer Gene (z.B. β -Lactamase, Georgiou et al. 1986) festgestellt werden.

Bei diesen unlöslichen Präzipitaten handelt es sich im wesentlichen um inaktive, unkorrekt gefaltete Proteine; vor einer Reinigung der rekombinanten Proteine müssen diese Aggregate unter Behandlung mit denaturierenden Reagenzien gelöst und anschließend wieder renaturiert werden (Übersicht über diese Methoden bei Marston 1987).

Die Bildung dieser "inclusion bodies" hängt wesentlich auch von den Kultivierungsbedingungen ab (Strandberg et al. 1987, Schein und Noteborn 1988).

Durch Vergleiche des proteolytischen Abbaus von identischen Fusionsproteinen, die zum einen in gelöster Form und zum anderen als unlösliches Präzipitat vorlagen, wurde gezeigt, daß die in solchen Aggregaten vorliegenden Proteine weitgehend gegen Degradierung geschützt sind (Hellebrust et al. 1989).

Der Vorteil der hohen Stabilität der in den unlöslichen Aggregaten enthaltenen, rekombinanten Proteine könnte für die weitere Etablierung von Fermentationsverfahren auf der Basis von Bakterien von besonderer Bedeutung sein. Die Entwicklung neuer Techniken ermöglicht in zunehmenden Maße die effiziente Reinigung und Renaturierung unlöslicher, rekombinanter Proteine (Hoess et al. 1988).

Eine vollkommen unterschiedliche Vorgehensweise stellt die Entwicklung von bakteriellen Expressionssystemen dar, in denen die rekombinanten Genprodukte aus der Zelle sekretiert werden. Durch die Sekretion der Proteine aus der Zelle unterliegen diese nicht mehr der intrazellulären Proteolyse.

Vertreter der Gram-positiven Gattung *Bacillus* sekretieren eine Vielzahl von (biotechnologisch interessanten) Proteinen direkt ins Medium. Dagegen sind bei den Gram-negativen Bakterien aufgrund der Zellwandstruktur Proteine, die durch die Plasmamembran ausgeschleust werden, im periplasmatischen Raum lokalisiert (Imanaka 1986). Durch Anlegen eines osmotischen Schocks sind aber auch diese Proteine relativ leicht aus der Flüssigkultur zu isolieren (Takahara et al. 1988). Bei der Verwendung von *Bacillus*-Systemen muß natürlich der Einfluß von extrazellulären Proteaseaktivitäten auf das rekombinante Genprodukt überprüft werden. Für *B. subtilis* sind Mutanten entwickelt worden, die keine aktiven, extrazelluläre Proteasen bilden (Kawamura und Doi 1984).

Die Analyse einer Vielzahl von Genen, die für extrazelluläre Proteine kodieren, hat zur Identifizierung von Sekretions-Signalsequenzen geführt (Kreil 1981). Mit Hilfe dieser DNA-Abschnitte sind eine Reihe von Vektoren konstruiert worden, die eine Sekretion des Genproduktes ermöglichen (Palva et al. 1983, Takagi et al. 1988, Takahara et al. 1988; Zusammenstellung weiterer Sekretionssysteme für *E.coli* bei Marston 1987).

Zusätzlich zu diesen Vorgehensweisen zur Stabilisierung der rekombinanten Genprodukte sind auch Charakterisierungen von wirtseigenen Genen durchgeführt worden, die die Stabilität der heterologen mRNA-Moleküle beeinflussen.

Hautala et al. (1979) sowie Kasunic und Kushner (1980) haben die gesteigerte Expression von eukaryotischen Genen in *E.coli*-Stämmen gezeigt, die einen Defekt im Gen für die Polynukleotid-Phosphorylase (pnp) aufweisen. Durch diese Mutation wird die Halbwertszeit der einem starken Abbau unterworfenen RNA-Moleküle wesentlich verlängert.

Zusammengefaßt kann festgehalten werden, daß zur Entwicklung bakterieller Wirts-/Vektorsysteme sowohl die Konstruktion stabil replizierender Expressionsvektoren als auch optimierter Wirtsstämme erforderlich ist. Der Verwendung von Bakterienstämmen, die definierte Mutationen in solchen Genen besitzen, welche die stabile Expression heterologer Gene beeinflussen, kommt dabei eine besondere Bedeutung zu. Aus diesem Grund werden in zunehmendem Maße Anstrengungen unternommen, die bei *E.coli* erhaltenen Erfahrungen zur Konstruktion geeigneter Produktionsstämme auch auf andere biotechnologisch relevante Bakterien zu übertragen.

II. Problemstellung

Das Interesse an der Einbeziehung methyilotropher Bakterien in industrielle Fermentationsprozesse beruht auf ihrer Fähigkeit, den billigen Rohstoff Methanol als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Zusätzlich stellen diese Methanol-Verwerter im allgemeinen nur geringe Substrat-Ansprüche, wodurch die Verwendung synthetischer Medien möglich ist (Faust et al. 1977, Westlake 1986).

In den siebziger Jahren wurden auf der Basis methyilotropher Bakterien Fermentationsverfahren zur Produktion von Einzeller-Protein (SCP, "single cell protein") entwickelt (Übersicht bei Dijkhuizen et al. 1985). Neben diesen im industriellen Maßstab durchgeführten Prozessen zur Proteinherstellung ist auch die Anwendung methyilotropher Bakterien zur Produktion von Aminosäuren, Vitaminen und extrazellulären Polysacchariden beschrieben worden (Tani und Yamada 1980, Tani 1985).

Seit einiger Zeit richtet sich das Interesse verstärkt auf die Verbesserung der bakteriellen Produktionsstämme, um die bereits bestehenden Fermentationssysteme zur Herstellung heterologer Proteine nutzen zu können. Im Gegensatz zu ihrer ausführlichen biochemischen (Anthony 1982) und taxonomischen (Hood et al. 1987, Jenkins und Jones 1987) Charakterisierung, die während der Entwicklung der Fermentationsverfahren erfolgte, sind methyilotrophe Bakterien bislang nur in geringem Maße genetisch bearbeitet worden. Die Ursache für diese mangelnde genetische Charakterisierung liegt vor allem darin, daß klassische Charakterisierungs-Methoden bei methyilotrophen Bakterien nur mit wenig Erfolg angewendet werden können (Übersicht bei Haber et al. 1983, Holloway 1984 a,b).

Die Herstellung von Mutanten durch energiereiche Strahlung und chemische Mutagene, die Genom-Kartierung durch Mobilisierung der chromosomalen DNA und die Entwicklung von Transformationstechniken sind bis heute nur bei einzelnen, meist fakultativ methylo trophen Bakterienarten wie *Methylobacterium* sp. AM1 und *Arthrobacter* P1 beschrieben worden (Tatra und Goodwin 1985, Nunn und Lidstrom 1986, Levering et al. 1987).

Dagegen sind mit Hilfe gentechnischer Methoden in den letzten Jahren erste Fortschritte bei der Genomanalyse verschiedener Methanol-verwertender Bakterien erzielt worden: Die Mutantenherstellung durch Transposonmutagenesen (Allen und Hanson 1985, Nunn und Lidstrom 1986) sowie die Identifizierung von Genen, deren Genprodukte an der C₁-Metabolisierung beteiligt sind, durch Komplementationsstudien (Moore et al. 1983, Holloway et al. 1987) ermöglichen eine grundlegende genetische Charakterisierung dieser Stämme. Zusätzlich wurden erste Wirts-/Vektorsysteme zur Überexpression heterologer Gene in dem obligat methylo trophen SCP-Produzenten *Methylophilus methylotrophus* vorgestellt (Windass et al. 1980, de Maeyer et al. 1982, Hennam et al. 1982).

Einer der biotechnologisch interessanten Vertreter der Methanol-verwertenden Bakterien ist das Gram-negative, obligat methylo trophe Bakterium *Methylomonas clara*, das durch Hohnloser et al. (1978) biochemisch charakterisiert worden ist. Zur industriellen Produktion von Einzeller-Protein sind in den siebziger Jahren für dieses Bakterium Fermentationsverfahren entwickelt worden (Faust et al. 1977). Mit der Identifizierung der nativen Plasmide pBE2 (48 kb) und pBE3 (16 kb) in einem *Methylomonas clara* Produktionsstamm (Stahl und Esser 1982) wurden die Grundlagen für eine genetische Bearbeitung dieses Bakteriums gelegt.

Die Charakterisierung der Plasmide zeigte, daß das kleinere Plasmid pBE3 ein Deletionsderivat des Plasmides pBE2 darstellt (Marquardt 1983, Marquardt et al. 1984). Die kryptischen Plasmide scheinen keine für die Wirtszelle essentiellen Funktionen zu kodieren, da mit dem Stamm B45-BE1 (Stahl und Esser 1982) ein plasmidfreier Wirt zur Verfügung steht.

Diese Vektoren bieten sich aufgrund ihrer hohen Stabilität (Stahl und Esser 1982) zur Entwicklung eines Wirts-/Vektorsystems für *Methylobacterium clausii* an. Neben der hohen Stabilität zeichnen sie sich durch einen engen Wirtsbereich aus, da sie in nicht direkt verwandten Bakterienarten nicht replizieren können (Marquardt 1983).

Dieser enge Wirtsbereich der Plasmide ist vor allem unter dem Gesichtspunkt der biologischen Sicherheit bei Fermentationsprozessen mit gentechnisch veränderten *M.clara*-Stämmen von Bedeutung.

Unter Verwendung des pBE2/pBE3-Replikationsursprunges, der durch Marquardt et al. (1984) und Kues (1988) lokalisiert und näher charakterisiert worden ist, sind Hybridvektoren zur Expression heterologer Gene in *Methylobacterium clausii* konstruiert worden (R. Marquardt, persönl. Mitteilung). Einige dieser Expressionsvektoren weisen eine hohe strukturelle Instabilität auf: Nach konjugativer Übertragung werden diese Konstrukte in *M.clara* entscheidenden strukturellen Umordnungen unterworfen. Diese können auf homologe Rekombinationsvorgänge zwischen (konstruktionsbedingten) identischen DNA-Sequenzen innerhalb der Vektormoleküle, aber auch zwischen Vektormolekülen und der chromosomalen DNA zurückgeführt werden (R. Marquardt, persönl. Mitteilung).

In dem bisher am besten analysierten, bakteriellen System (*E.coli*) werden solche homologen Rekombinationsvorgänge durch das RecA-Protein hervorgerufen (vgl. I. Einführung).

Das *E.coli* RecA-Protein katalysiert die Paarung zwischen doppelsträngigen DNA-Molekülen und homologen, einzelsträngigen DNA-Abschnitten. Unter Bildung eines Heteroduplex (D-Schleifen-Bildung) kommt es zu einem Strang-austausch zwischen den beteiligten DNA-Molekülen (Übersicht bei Kowalczykowski 1987, West 1988).

Neben dieser Rekombinations-auslösenden Funktion nimmt das RecA-Protein eine Schlüsselrolle bei der Regulation des induzierbaren DNA-Reparatursystems, der sog. SOS-Reparatur, ein (Claverys und Lacks 1986, Walker 1987).

Durch Mutationen im *E.coli* *recA*-Gen wird die Fähigkeit, homologe Rekombinationsprozesse zu induzieren, in solchen Mutanten nahezu vollständig unterdrückt (Clark 1973).

In einer Vielzahl unterschiedlicher Bakteriengattungen ist die Existenz *recA*-ähnlicher Gene nachgewiesen worden (s. V. Diskussion, Tab. 6). Bei den bisher konstruierten *recA*-Mutanten unterschiedlicher Bakterienarten (s. I. Einführung, Tab.3) wurde in gleicher Weise wie bei den *E.coli* *recA*-Mutanten ein vollständiges Fehlen homologer Rekombinationsvorgänge beobachtet.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, eine rekombinationsdefekte *Methylomonas clara*-Mutante zu konstruieren, um die strukturelle Instabilität der Expressionsvektoren in *M.clara* zu reduzieren. Eine solche *recA*-Mutante wäre für die Entwicklung eines Wirts-/Vektorsystems für dieses biotechnologisch interessante Bakterium von großer Bedeutung.

Zu diesem Zweck soll zunächst die Existenz eines *recA*-ähnlichen Genes in *M.clara* nachgewiesen werden. Da klassische Mutagenesetechniken bei methyloTROPHEN Bakterien bisher nur mit geringem Erfolg angewendet werden können (Holloway 1984 a,b), ist zur Herstellung einer *M.clara* *recA*-Mutante die Isolierung und Charakterisierung dieses Genes aus dem *M.clara* Genom erforderlich. Nach einer *in vitro*-Modifizierung des *recA*-Genes soll diese inaktivierte Kopie in *M.clara* eingeführt und gegen die native Genkopie ausgetauscht werden.

Die geplante experimentelle Vorgehensweise wird in einem Diagramm (Abb. 2) dargestellt.

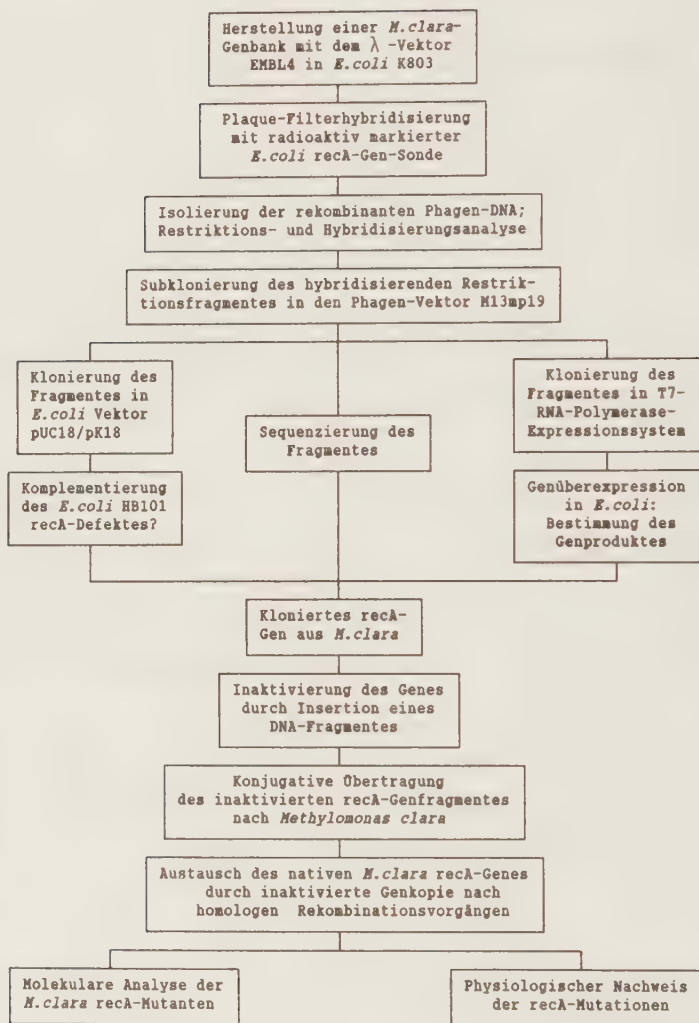


Abb. 2
Darstellung der geplanten experimentellen Vorgehensweise zur Konstruktion einer *M. clara* recA-Mutante.

III. Material und Methoden

Stämme

Escherichia coli K12:

RR1 (F⁻, hsdR, hsdM, leu, proA2, thi, lacY1, galK2, ara-14, xyl-5, mtl-1, rpsL20 (Str^R), supE44, Lambda⁻; Boyer und Roulland-Dussoix 1969).

HB101 (identisch mit *E.coli* RR1 außer recA13; Bolivar et al. 1977)

DH1 (F⁻, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (rk⁻, mk⁺), supE44, relA1, Lambda⁻; Hanahan 1983).

JM83 (ara, Δ (lacpro), strA, thi-1, (Φ 80d-lacZ Δ M15); Messing 1982) für die Vermehrung von pUC18/19 und pK18/19 Plasmiden sowie deren Derivate.

SMH50 (endA, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, y⁻, Δ (lacproAB), (F', traD36, proAB, lacIqZ Δ M15, Yanisch-Perron et al. 1985) als Rezipientenstamm für die Transfektion mit M13-Derivaten.

BHB2688 (N205 recA⁻ (Lambda imm434, cIts857, b2, red3, Eam4, Sam7) und BHB 2690 (isogen mit BHB2688, außer Dam15 statt Eam4) (Hohn 1979) für die Herstellung der Lambda-DNA-Verpackungs-extrakte.

K38 (HfrC Lambda, Russel und Model 1985, enthält das Plasmid pGP1-2) als Wirtsstamm für die Überexpression des *M.clara* recA-Gens.

K803 (F⁻, hsdR514 (rk⁻, nk⁻), supF58, lacY1, galK2, galT22, metB1, trpR55; Fedoroff 1983) als Rezipientenstamm für die Transfektion mit Lambda-Phagen.

Methylobionas clara:

Ausgangsstamm FH-B-5460 (ATCC 31226), beschrieben bei Hohnloser et al. 1978

Stamm B45-BE1 (plasmidlos), aus einer 40 m³-Kultur einer Fermentations-Pilotanlage der Hoechst AG/Frankfurt M. isoliert (Stahl und Esser 1982, Marquardt et al. 1984); als Rezipientenstamm in den Konjugationsexperimenten wurde eine (durch R. Marquardt hergestellte) Streptomycin-resistente Mutante (R8520) des Stammes B45-BE1 verwendet.

Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Vektoren und rekombinanten Plasmide sind in der folgenden Tabelle (4) zusammengefaßt.

Plasmid	Größe/kb	Charakterisierung	Referenz/Herkunft
R751 ColK/Kan	53 7.1	konjugatives Plasmid, Trimethoprim-Resistenz ColK-Derivat, kleines EcoRI-Fragment durch Kanamycin-Resistenzgenkassette ersetzt	Thomas & Smith 1987 R. Marquardt, Frankfurt
pBR322	4.36	Ampicillin-/Tetracyclin-Resistenz	Bolivar et al. 1977
pUC18	2.69	Ampicillin-Resistenz	Vieira & Messing 1982
pK18	2.66	Kanamycin-Resistenz	Pridmore 1987
pUC4K	4.0	Kanamycin-Resistenzgen-Kassette	Vieira & Messing 1982

Tabelle (4) Fortführung

Plasmid	Größe/kb	Charakterisierung	Referenz/Herkunft
ML3mp19	7.25	ML3-Sequenzierungsvektor	Norlander et al. 1983
pMCR101	8.5	ML3mp19 + 1.25 kb EcoRI/HindIII-recA-Fragm.	Ridder, diese Arbeit
pMCR112	8.5	pMCR101, Basenaustausch A/G Position 702	" " "
pMCR113	8.5	pMCR101, Basenaustausch C/A Position 250	" " "
pMCR114	8.5	pMCR101, Basenaustausche A/G Pos. 702 und C/A Position 250	" " "
pMCR1		pUC18 + M.c. 1.25 kb recA-Fragment	Ridder, diese Arbeit
pMCR10	3.95	pUC18 + M.c. 1.25 kb recA-Fragment	" " "
pMCR12	3.95	pUC18 + M.c. 1.25 kb recA-Fragment, Basenaustausch A/G Position 702	" " "
pMCR13	3.95	pUC18 + M.c. 1.25 kb recA-Fragment, Basenaustausch C/A Position 250	" " "
pMCR14	3.95	pUC18 + M.c. 1.25 kb recA-Fragment, Basenaustausche A/G Pos. 702 + C/A Pos. 250	" " "
pMCR12K	5.2	pMCR12 + 1.27 kb BamHI-Kanamycin-Kassette	" " "
pMCR13K	5.2	pMCR13 + " " " " "	" " "
pMCR14K	4.75	pMCR14 + " " " " "	" " "
		Deletion von 455 bp im recA-Fragment	
pMCR312K	6.9	wie pMCR12K, in pBR322	" " "
pMCR313K	6.9	wie pMCR13K, in pBR322	" " "
pMCR314K	6.45	wie pMCR14K, in pBR322	" " "
pGP1-2	7.2	pACYC177-Derivat, kodiert T7-RNA-Polymerase, Kanamycin-Resistenz	Tabor & Richardson 1985
pT7-3	2.42	pBR322-Derivat, Promotor für T7-RNA-Polymerase, Ampicillin-Resistenz	Tabor & Richardson 1985
pMCB7-3	3.67	pT7-3 + M.c. 1.25 kb recA-Fragment	Ridder, diese Arbeit

Verwendete Chemikalien

Acrylamid (Serva), Agar: Agar-agar (Oxoid, Merck, Serva), Bacto-Agar (Difco Laboratories Detroit Michigan), Agarose (Seakem Marine, Colloids Div FMC Corp.), Ammoniumpersulfat (Riedel de Haën), Bisacrylamid (N,N'-Methylenbisacrylamid) (Serva), Borsäure (Riedel de Haën), Brij 58 (Serva), Cäsiumchlorid (Biomol), Coomassie-Blau (Serva), DDT = Dithiothreitol (Boehringer), Dextran (Serva), EDTA = Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure-Dinatriumsalz (Aldrich), Ethidiumbromid (Sigma), Formamid (Merck), Harnstoff (Merck, BRL), IPTG = Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (Boehringer), β -Mercaptoethanol (Serva), Methanol (Riedel de Haën), Natriumdesoxycholat (Merck), PEG = Polyethylenglycol 4000/6000 (Merck), Pepton - tryptisch verdaut (Merck), Proteinstandard (Biorad Laboratories Richmond California), RSA = Rinderserumalbumin (Serva), Saccharose (Merck), SDS = Natriumlaurylsulfat (Roth), Sephadex G-50 (Pharmacia), TEMED = N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (Serva), Thiamin (Serva), Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Serva), X-Gal = 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (Boehringer), Triton-X-100 (Serva), YE Hefeextrakt (Difco)

Antibiotika:

Ampicillin, Kanamycin, Rifampicin, Streptomycin und Tetracyclin (Serva), Trimethoprim (Sigma)

Nukleotide und Nukleinsäuren:

Desoxy- und Didesoxynukleosid-5'-Triphosphate (Boehringer), Desoxycytidin-triphosphat- α -S (New England Nuclear Boston), Heringsperma-DNA (Nutrition Biochemicals Corp.), Lambda DNA, isoliert aus *E.coli* K12 (*lambda* CI857 Sam 7) (W. Rüger, Bochum)

Radiochemikalien:

(α - 32 P) dNTP und (γ - 32 P) ATP (spez. Aktivität: ca. 3000 Ci/mmol), (α - 35 S) dATP (spez. Aktivität: ca. 1000 Ci/mmol), (L- 35 S) Methionin (spez. Aktivität: ca. 1500 Ci/mmol) (Amersham Buchler)

Verwendete Enzyme:

DNA-Polymerase I (Boehringer), DNase I (Boehringer), Exonuklease III (New England Nuclear Boston), Klenow-Fragment (Boehringer), Lysozym (Boehringer), Restriktionsenzyme (Boehringer, BRL, Genofit), RNase (Boehringer), Sequenase (United States Biochemical Corp.), terminale Transferase (Boehringer), T4 DNA Ligase (Boehringer), T4 Polynukleotidkinase (Pharmacia)

Papiere, Dialysemembranen:

3MM-Papier, Nitrocellulose-Membran-Filter für Kolonie- und Plaquefilterhybridisierungen (Schleicher & Schüll), für Konjugationen (Sartorius), Dialysefilter (Millipore)

Häufig verwendete Puffer und Lösungen:

IPTG: 100mM IPTG in H₂O dest.
SM: 0.58% NaCl, 0,2% MgSO₄ x 7 H₂O, 50 mM TrisHCl pH 7.5, 0.02% Gelatine
SSPE-Puffer: 0.18 M NaCl, 1mM EDTA, 10mM Natriumphosphat (Na₂HPO₄ x 2 H₂O, NaH₂PO₄ x 2 H₂O), pH 7.4
TE-Puffer: 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl, pH 8.0
Tris-Acetat-Puffer: 40mM Tris, 20mM NaAcetat, 2mM EDTA, pH 8.3
Tris-Borat-Puffer: 100mM Tris, 100mM Borsäure, 2mM EDTA, pH 8.3
X-Gal: 2% X-Gal in Dimethylformamid

Nährmedien und Kulturbedingungen

Anzucht von *Methylobacterium clara*:

Minimalmedium M36 (0.1% H₃PO₄, 0.083% K₂SO₄, 0.018% Na₂SO₄, 0.036% MgSO₄ x 7 H₂O, 0.004% CaCO₃, 0.015% Citrat, 0.005% (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ x 6 H₂O, 80 µl/l Spurenelementlösung, 0.8% Methanol).

Spurenelementlösung für M36 (0.05g H₃BO₃, 0.01g KJ, 0.04g MnSO₄ x 4 H₂O, 0.04g ZnSO₄ x 7 H₂O, 0.02g (NH₄)₆Mo₇O₂₄, alle Angaben pro Liter

Zur Herstellung von M36-Festmedium wurde 2.0 % Difco-, Oxid- oder Merck-Agar zugesetzt. Zur Selektion wurden den Kulturen ggf. Streptomycin (100µg/ml), Kanamycin (20 µg/ml) und Ampicillin (30 µg/ml) zugegeben.

Durch Zugabe von nur 0.8% Methanol (statt der bislang eingesetzten 1.5% Methanol; Marquardt 1983, Kües 1988), Anzucht der *M.clara*-Stämme in 50ml Schüttelkulturen (280 UPM) bei nur 30-32°C sowie 2%iges Überimpfen im 24-Stunden-Rhythmus konnten die

Kulturen dauerhaft vollständig schleimfrei gehalten werden.

Anzucht von *Escherichia coli*:

Stämme CSH56, DH1, HB101, JM83 und RR1 bei 37°C (BHB2688, BHB2690 und K38 bei 32°C) und 280 UPM in LB-Medium (1% Bacto-Trypton, 0.5% NaCl, 0.5% Hefeextrakt, pH 7.4); ggf. unter Zugabe von Ampicillin (80 µg/ml), Kanamycin (50 µg/ml), Rifampicin (100 µg/ml), Tetracyclin (12.5 µg/ml), Trimethoprim (100 µg/ml). Stamm SMH50 bei 37°C und 280 UPM in YT-Medium (0.8% Bacto-Trypton, 0.5% NaCl, 0.5% Hefeextrakt, pH 7.8)

Selektionsmedium zur Isolierung von JM83-Transformanten:

LB-Festmedium (2% Agar-agar) mit Ampicillin (80 µg/ml), und X-Gal (20 µg/ml)

Selektionsmedium zur Isolierung von SMH50-Transformanten:

LB-Festmedium (2% Agar-agar) überschichtet mit 5 ml 0.4% Weich-agar, 50 µl IPTG (0.2 mM), 50 µl X-Gal (20 µg/ml), 300 µl log. wachsenden SMH50-Zellen und transformierten SMH50-Zellen

UV-Bestrahlung der *E.coli*- und *M.clara*-Kulturen:

Bestimmung der Resistenz der Bakterienstämme gegenüber UV-Bestrahlung durch Ausplattierung log. wachsenden Kulturen (OD ca. 0.6-0.8) auf Festmedium, unterschiedlich lange Bestrahlung im definierten Abstand zur "clean bench"-UV-Lampe (254 nm), Inkubation der Platten im Dunkeln für 24-72 h bei 37°C und Feststellung der Überlebensrate durch Auszählen der Kolonien; Bestimmung der UV-Dosis mittels Dosimeters (Black Ray Ultraviolet Meter Model J-225, Ultra-violet Products Inc. San Gabriel).

DNA-Isolierung

Plasmid-DNA-Isolierung aus *E.coli*: nach Birnboim und Doly (1979), mit den Änderungen von Osiewacz (1984)

Plasmid-DNA-Schnellisolierung aus *E.coli*: zur raschen Charakterisierung von *in vitro* rekombinierter Plasmid-DNA; nach Osiewacz (1984)

Isolierung der Gesamt-DNA aus *E.coli* und *M.clara*:

Zur Isolierung kleinerer Mengen an bakterieller Gesamt-DNA wurden 10 ml einer Übernacht-Kultur abzentrifugiert, in 3 ml 25% Sucrose/0.05M Tris pH 8.0 resuspendiert und 5 min in Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1.5 ml Lysozymlösung (5 mg/ml in 0.25 M EDTA pH 8.0), weiterer 5 min-Inkubation in Eis wurden 3 ml SDS-Lösung (1% SDS in 0.05 M Tris/0.06 M EDTA pH 8.0) hinzugegeben, vorsichtig durchmischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine Extraktion mit Phenol, Phenol/Chloroform und Chloroform. Durch Zugabe des 2fachen Volumens Ethanol wurde die DNA ausgefällt und in DNase-freier RNase-Lösung aufgenommen.

Restriktion und Gelelektrophorese

Restriktion der DNA nach Maniatis et al. (1982), Auftrennung der erhaltenen DNA-Fragmente in 0.6 - 1.0 %igen Agarosegelen in Tris-Acetat-Puffer nach McDonell et al. (1977), modifiziert nach Kück (1981). Bestimmung der Größe der aufgetrennten Fragmente durch Vergleich mit HindIII-restringierter *Lambda*-DNA.

Zur Auftrennung der Sequenzierungsproben wurden in der Regel

8%ige Polyacrylamidgele (38:2, 35 g Harnstoff, 23.3 ml H₂O, 7 ml 10fach konz. Tris-Borat-Puffer, 470 µl 10%iges Ammoniumpersulfat und 15 µl TEMED) verwendet.

DNA-Ligation und *E.coli*-Transformation

DNA-Ligationen nach King und Blakesley (1986); *E.coli*-Transformationen wurden nach der CaCl₂-Standardmethode (Cohen et al. 1972, modifiziert nach Maniatis et al. 1982) durchgeführt. Bei Verwendung von pUC- sowie pK-Vektoren erfolgte die Selektion rekombinanter Klone durch Zusatz von X-Gal zu den Antibiotika-haltigen Festmedien (Langley et al. 1975, Vieira und Messing 1982).

Lambda-Klonierung

Anlage der *M.clara*-Genbank in Lambda-Vektor EMBL4 nach Frischauf et al. (1983), jedoch ohne Phosphatase-Behandlung der Insert-DNA; Ligation von 1.0 µg Vektor- und 0.5 µg Insert-DNA. Verpackung nach Maniatis et al. (1982) bzw. mit dem DNA-Verpackungssystem "Gigapack" (Genofit) nach Herstellerangaben.

DNA-DNA-Hybridisierungen

Übertragung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen auf Nitrocellulose-Filter nach Southern (1975); Plaquefilterhybridisierungen nach Benton und Davis (1977), Koloniefilterhybridisierungen nach Grunstein und Hogness (1975). DNA-Sonden wurden durch "nick translation" (Rigby et al. 1977), Oligonukleotide unter Verwendung der T4-Polynukleotid-Kinase am 5'-Ende (Maxam und Gilbert 1980) mit ³²P markiert. Hybridisierungen erfolgten unter stringenten Bedingungen: Vorhybridisierung (50% Formamid, 5 x SSPE, 0.2% SDS 100 µg/ml Heringssperma-DNA, bei Oligonukleotiden ohne Formamid und Heringssperma-DNA) 4 h 37°C, Hybridisierung mit ³²P markierter DNA 16 h 37°C, Entfernung der unspezifisch gebundenen DNA durch Waschen mit 5 x SSPE/0.2% SDS, Autoradiographie der getrockneten Filter bei -20°C für 2-72 h (Kodak x-Omat AR Röntgenfilme, Kodak x-Omatic Regular Verstärkerfolien).

DNA-Sequenzierung

Bestimmung der Basenabfolge nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger et al. 1977), modifiziert nach Messing (1983) unter Verwendung der Klenow-Polymerase und des Sequenase-Kits (United States Biochemical Corp.); als Startersequenzen ("primer") wurden neben M13-spezifischen auch drei *M.clara* recA-Gen-spezifische Oligonukleotide verwendet. Erzeugung der sequentiell verkürzten M13-mp19 Phagen zur Sequenzierung nach Dale et al. (1985). Auswertung der erhaltenen Sequenzdaten mittels Computeralyse (IBM-kompatibler PC; Computer-Programme: DNA- und Protein-Homologieanalyse (Lipmann und Pearson 1985), Translation und Sekundärstrukturanalyse (Lang und Burger 1986), Restriktionsanalyse (Mount und Conrad 1986), Hydropathie-Analyse (Karsch 1988).

Herstellung der Oligonukleotide

Oligonukleotidsynthese nach der β -Cyanoethyl-Phosphoramidit-Methode (Sinha et al. 1984) mit einem DNA-Synthese-Apparat (Applied Biosystems Modell 381A). Behandlung der Oligonukleotide vor dem Gebrauch: (1) Abspaltung der basenlabilen Schutzgruppen, (2) Reinigung mittels Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC), (3) Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen.

Folgende Oligonukleotide wurden eingesetzt:

Oligon.	271	5'-CCTGCGCGAGGATCCAGCG-3'	(Sequenzierung)
"	282	5'-TTATTAACCGGATCCGTATGAAGA-3'	(Mutagenese)
"	283	5'-TAACATCAAGCGTACCA-3'	(Sequenzierung d. Mutation)
"	284	5'-CCGCACTTTCCCAAAT-3'	(Sequenzierung d. Mutation)
"	289	5'-GTTTCCACCGGATCCCTGGGTCTG-3'	(Mutagenese)
"	386	5'-TTAACCAGATCCGTATGA-3'	(Nachweis recA-Mutation)

Ortsspezifische in vitro Mutagenese

In vitro Mutagenese der *M. clara* recA-Gen-Sequenz unter Verwendung synthetisch hergestellter, mutierender Oligonukleotide nach der von Taylor et al. (1985a,b) beschriebenen Methode. Die Inkorporation von Desoxycytidin-triphosphat- α -S in den (-)-Strang der pMCRI01-DNA führt dazu, daß nur der nicht-mutierte (+)-Strang durch PvuI geschnitten und während der Mutagenese durch Exonuklease III entfernt werden kann.

Gen-Überexpression in Escherichia coli

Zur Überexpression wurde das von Tabor und Richardson (1985) entwickelte Bakteriophage T7 RNA-Polymerase/Promoter-System verwendet.

1) Optimierte Proteinüberproduktion: Anzucht der *E. coli*-Klone (enthalten pGP1-2/pT7-7 + Fragment) bei 30°C in LB-Komplettmedium bis $OD_{590} = 1.5$, Inkubation 25 min bei 42°C, Zugabe von Rifampicin (Endkonzentration 100 μ g/ml), Inkubation 2 h bei 37°C, Abzentrifugation, Aufnahme des Zellpellets in 50 μ l H₂O, Zugabe von 25 μ l 3xProbenpuffer (60mM TrisCl pH 6.8, 1% SDS, 1% β -Mercaptoethanol, 10% Glycerin, 0.01% Bromphenolblau), Inkubation 3 min bei 95°C, Auftrennung der Proteine in 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen nach Laemmli (1970), Anfärben der Proteine mit Serva Blau R (= Coomassie Brilliant Blue G250).

2) Radioaktive Markierung der plasmidkodierte Proteine: Anzucht der *E. coli*-Klone (s. (1)) bei 30°C in LB-Komplettmedium, Abzentrifugation bei Erreichen der $OD_{590} = 0.5$, Waschen mit Minimalmedium, weitere Inkubation der Zellen in 1 ml Minimalmedium + 20 μ g/ml Thiamin + 0.01 % 18 L-Aminosäuren (außer Methionin und Cystein) 1 h bei 30°C, Inkubation 15 min bei 42°C, Zugabe von Rifampicin (200 μ g/ml Endkonzentration), Inkubation 20 min bei 30°C, Zugabe von 10 μ Ci 35 S-Methionin, Inkubation 5 min bei 30°C, Abzentrifugation, Aufnahme des Zellpellets und Auftrennung der Proteine wie bei (1), Autoradiographie der getrockneten Gele mit Filmen und Verstärkerfolien wie für "DNA-DNA-Hybridisierungen" beschrieben.

Konjugationsexperimente

Konjugationen zwischen *E.coli* und *M.clara* nach der von Simon et al. (1983) beschriebenen Filtermating-Methode. Konjugationsdauer: zwischen 6 und 12 Stunden auf LB-Agar.

Sicherheitsmaßnahmen

Alle Transformationsexperimente erfolgten unter L2/B1-Bedingungen gemäß den "Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch in vitro rekombinierte Nukleinsäuren" des Bundesministers für Forschung und Technologie (Bonn) vom 28.Mai 1986.

IV. Ergebnisse

A) Isolierung des *Methylobacterium* *clara* *recA*-Genes

Die Herstellung einer rekombinationsdefekten *Methylobacterium clara*-Mutante erfordert die Isolierung des *recA*-ähnlichen Genes aus der chromosomalen DNA dieses Bakteriums (s. II. Problemstellung).

1. Identifizierung des Genes durch heterologe Hybridisierung

Zur Identifizierung des *recA*-ähnlichen Genes wurde chromosomale DNA des *Methylobacterium clara*-Stammes B45-BE1 isoliert und durch verschiedene Restriktions-Endonukleasen (u.a. EcoRI, HindIII) vollständig verdaut.

Durch Wiederholung dieser Restriktionen und Vergleich der dabei entstandenen Restriktionsmuster nach gelelektrophoretischer Auftrennung der einzelnen Fragmente wurde die Vollständigkeit der Verdauungen überprüft.

Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden mit einer radioaktiv markierten *E.coli recA*-Gensonde hybridisiert.

Bei der eingesetzten *recA*-Gensonde handelt es sich um das Hybridplasmid pBT5, das aus einem von E.Lanka (Berlin) zur Verfügung gestellten *Bacillus subtilis* Stamm isoliert wurde. pBT5 besteht aus dem *B.subtilis*-Expressionsvektor pPL608 (Williams et al. 1981a,b), in den das *E.coli recA*-Gen integriert worden ist. Zusätzliche DNA-Sequenzen aus Gram-negativen Bakterien enthält pBT5 nicht. Für die Hybridisierungsexperimente wurde die gesamte Vektor-DNA eingesetzt.

Diese unter stringenten Bedingungen (50% Formamid) durchgeführten Hybridisierungsexperimente ergaben (Abb. 3):

- (1) Die *E.coli recA*-Gensonde hybridisiert mit einem 10.5 kb großen EcoRI- und einem 5.1 kb großen HindIII-Fragment der chromosomalen *Methylobacterium clara*-DNA. Daneben war bei der HindIII-Restriktion eine weitere, schwächere Hybridisierung mit einem größeren Fragment zu beobachten.

2. Konstruktion einer *M.clara*-Genbank

Zur Klonierung des 10.5 kb großen EcoRI-Fragmentes, das mit der *E.coli recA*-Gensonde hybridisiert, wurde eine Genbank der chromosomalen *M.clara*-DNA mit Hilfe des Lambda-Phagenvektors EMBL4 (Frischauf et al. 1983) angelegt.

Aufgrund der relativ geringen Klonierungskapazität von Plasmidvektoren und der häufig beobachteten Instabilität von Cosmidvektoren (Winnacker 1985) bieten sich diese nicht für die Klonierung des gewünschten *M.clara*-Fragments an. Lambda-Vektoren sind zudem gerade bei der Klonierung eines Genes, das Rekombinationsprozesse katalysiert, gegenüber den in hoher Kopiezahl in der Zelle auftretenden Plasmid- und Cosmidvektoren von Vorteil.

Die Größe der in diesem Lambda-Substitutionsvektor klonierbaren, heterologen DNA-Fragmente wird durch die minimale sowie die maximale Größe der *in vitro* verpackbaren DNA auf 10 - 24 kb begrenzt (Frischauf et al. 1983).

Chromosomale DNA des *M.clara*-Stammes B45-BE1 wurde vollständig mit EcoRI geschnitten. 0.5 µg dieser geschnittenen DNA wurden in die EcoRI-Schnittstelle des EMBL4-Vektors (Genofit; 1.0 µg Vektor-DNA) ligiert. Die *in vitro*-Verpackung der rekombinanten DNA-Moleküle erfolgte zunächst mit selbst hergestellten Verpackungsextrakten (isoliert aus *E.coli*-Stämmen BHB2688 und BHB2690). Durch Verwendung des Gigapack Plus-Verpackungsextraktes (Stratagene) wurde bei der anschließenden Transfektion des *E.coli*-Stammes K803 die Effizienz um den Faktor 10 gesteigert.

Die hergestellte *M.clara*-Genbank enthält ca. 8×10^4 voneinander unabhängige Lambda-Klone. Nach der von Clarke und Carbon (1976) beschriebenen Berechnungsmethode sind (bei einer angenommenen, *E.coli*-ähnlichen Größe des *M.clara*-Genoms von 3750 kb und einer durchschnittlichen Fragmentgröße von 15 kb) 1150 rekombinante Lambda-Klone erforderlich, damit jede DNA-Sequenz mit einer 99%igen Wahrscheinlichkeit in der Genbank enthalten ist.

Bei der Berechnung muß berücksichtigt werden, daß es sich in diesem Fall nicht um eine repräsentative Genbank handelt: Durch die vollständige Verdauung der genomischen DNA (speziell bei der Verwendung von Restriktionsenzymen mit hexameren Erkennungsstellen) wird eine Vorselektion gegen diejenigen Fragmente durchgeführt, die entweder zu groß für eine Klonierung oder zu klein für einen späteren Nachweis sind. Zusätzlich sind bei einer solchen Vorgehensweise *in vitro*-Rekombinationen durch die Ligation ursprünglich nicht benachbarter Fragmente zu erwarten (Karn et al. 1980). Für

die gewünschte Klonierung des 10.5 kb großen EcoRI-Fragmentes sind diese grundsätzlichen Nachteile jedoch nicht von Bedeutung, sondern sie erhöhen die Wahrscheinlichkeit dafür, dieses Fragment zu klonieren.

Die Identifizierung der rekombinanten Lambda-Klone, die das 10.5 kb große EcoRI-Fragment enthalten, erfolgte durch Plauefilter-Hybridisierung (Benton und Davis 1977) unter Verwendung der radioaktiv markierten pBT5-Sonde.

Die DNA einzelner Lambda-Plaques, die positive Hybridisierungssignale zeigten, wurde über DNA-Minipräparationen isoliert. Nach Verdauung der DNA durch Restriktionsendonukleasen wurden die Fragmente auf Nitrozellulosefilter übertragen und mit pBT5-DNA hybridisiert.

Die analysierten Lambda-Klone weisen neben dem rechten (9.5 kb) und dem linken (19.5 kb) EMBL4-Vektorarm das 10.5 kb große, mit pBT5 hybridisierende EcoRI-Fragment auf.

Neben diesem Fragment enthalten die untersuchten Klone bis auf eine Ausnahme (Klon 40-2) zusätzliche *M. clara* EcoRI-Fragmente unterschiedlicher Größe. Dies ist auf die oben beschriebene Vorgehensweise bei der Herstellung der Genbank zurückzuführen.

Die tatsächliche Klonierung des gewünschten 10.5 kb großen EcoRI-Fragmentes wurde durch parallele Auftrennung von restringierter *M. clara* Gesamt-DNA und Lambda 40-2 DNA und nachfolgender pBT5-Hybridisierung belegt. Die Hybridisierung des 10.5 kb großen, gelabelten Fragmentes aus Lambda-Klon 40-2 mit dem entsprechenden Fragment der chromosomalen *M. clara* DNA weist die Herkunft des klonierten Fragmentes nach.

Durch weitere Restriktions- und Hybridisierungsanalysen wurde die Lage der mit dem Vektor pBT5 hybridisierenden DNA-Sequenzen auf ein 1.25 kb großes EcoRI-/HindIII-Fragment eingegrenzt (Abb. 4).

2. Bestimmung der DNA-Sequenz des *recA*-Genes

Zur Ermittlung der Basenabfolge des hybridisierenden Fragmentes nach der von Sanger et al. (1977) entwickelten Didesoxy-Kettenabbruch-Sequenzierungsmethode wurde das 1.25 kb große EcoRI-/HindIII-Fragment in den Sequenzierungsvektor M13mp19 subkloniert (Abb. 4).

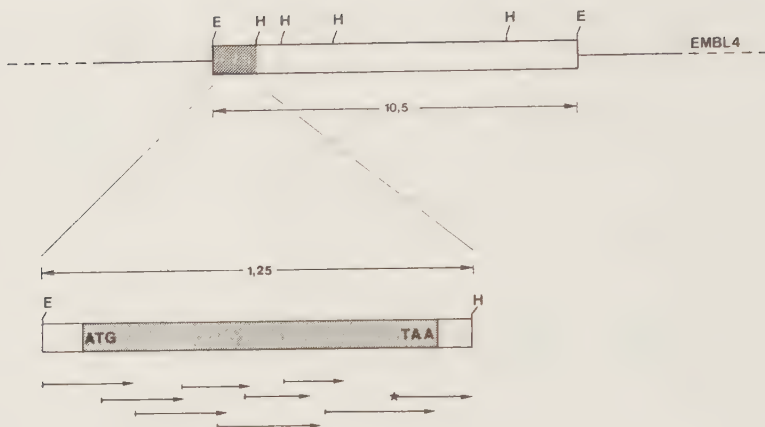


Abb. 4

Subklonierung des mit der *E.coli recA*-Gensonde hybridisierenden 1.25 kb großen *M.clara* DNA-Fragmentes aus dem Lambda-EMBL4-Klon 40-2 in den Sequenzierungsvektor M13mp19 (pMCR101). E = EcoRI, H = HindIII, Angaben der Größen in kb. Im unteren Abschnitt ist die Sequenzierungsstrategie zur Ermittlung der Nukleotidsequenz dieses *M.clara* DNA-Fragments dargestellt. Der grau unterlegte Bereich in diesem Ausschnitt enthält die kodierende Sequenz des *M.clara recA*-Genes. ATG = Startcodon des Genes, TAA = Terminationscodon des Genes. Pfeile geben die Richtung und ungefähre Länge der einzelnen ermittelten Teilsequenzen des Fragmentes. * = zur Sequenzierung dieses Bereiches wurde das Oligonukleotid 271 (s. III. Material und Methoden) eingesetzt.

Das in dem erhaltenen M13mp19-Hybridvektor pMCR101 klonierte Fragment kann aufgrund seiner Größe (unter Verwendung des universellen M13mp19-Oligonukleotid-Primers) nicht vollständig sequenziert werden. Daher wurde das *M.clara* Fragment mit der von Dale et al. (1985) beschriebenen Technik zur Herstellung überlappender Klone sequentiell verkürzt. Die Sequenzbestimmung der dabei erhaltenen Hybridvektoren erfolgte nach der in Abbildung 4 gezeigten Strategie. Die ermittelte Nukleotidsequenz des *M.clara*-Fragmentes und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz ist in Abbildung 5 dargestellt.

1 GA ATT CAT GGC TTC GCC ATT TCA CTG ATG GTC GAT TTA TGA AAT AAT TAG

51 AAG TTA TTG TTT GGA TTA TAT AGC GTT TGT ATA AAC AGC GCA TTT TTA TCG
K L L F G L Y S V C I N S A F L S

102 CTA ATA AAG AAG GTA ATC AGC ATG GAT GAC AAC AAA AGC AAA GCG CTC GCC
L I K K V I S M D D N K S K A L A

153 GCC GCA CTT TCC CAA ATT GAA AAA CAG TTC GGC AAA GGC TCC ATT ATG CGC
A L A S Q I E A Q F G K G S I M R

204 ATG GGC GAT GCT GAT ATC GGC GAA GAC CTG CAA GTG GTT TCC ACC GGC TCC
M G D A D I G E D L Q V V S T G G S

255 CTG GGT CTG GAT ATC GCA CTG GGG GTG GGT GGC TTG CCA CGT GGC CGT ATT
L G L D I A L G V G G L P R G R I

306 ATC GAA ATT TAT GGC CCT GAG TCT TCA GGT GAA ACC TCA TTG ACC TTG TCT
I E A I Y G C F E S G K A T L T T S

357 GCC ATT GCC GAA ATG CAA AAG CTG GGT GGT GTC GCA GCA TTT ATC GAC GCG
A I A E M Q K L G G V A A F I D A

408 GAC GAT GCC CTG GAC CCG CAA TAC GCG TCC AAG CTG GGC GTG AAT GTG CCA
D D A L D P Q Y A S K CTG GGC V N V P

459 GAG TTG TTG ATT TCA CAG CCA GAC ACC GGC GAA CAG GCG CTG GAA ATC GCC
E L L I S Q P D T G E Q A L E I A

510 GAT ATG CTG GTG CGC TCC GGT TCC GTG GAT ATC GTG GTG GTG GAC TCG GTA
D M L V R S G S V D I V V V D S V

561 GCT GCC TTG ACT CCG CGT GCC GAA ATT GAA GGT GAA GCG GAC AGC CAT
A A L T P R A E I E GGT GAA M G G D S H

612 ATG GGT TTG CAG GCA CGC TTG ATG TCA CAG GCA TTG CGT AAA CTG ACT GGT
M G L Q A R L M S Q A L R K L T G

663 AAC ATC AAG CGT ACC AAT ACG CTG GTG ATT TTT ATT AAC CAG ATC CGT ATG
N I K R T N T L V I F I N Q I R M

714 AAG ATC GGT GTC ATG TTC GGC AAT CCG GAA ACG ACC ACC GGC GGT AAC GCG
K I G V M F G N P E T T G G G N A

765 CTC AAG TTT TAC TCC TCA GTC CGT CTC GAT ATC CGC CGT ACC GGT GCG ATT
L K F Y S S V R L D I C R R T G I

816 AAA AAA GGC GAC GAG GTC ATT GGC TCC GAG ACC AAG GTG AAG GTG ATC AAG
K K G D E V I G S E T K V K V I K

867 AAC AAG GTT GCG CCG CCG TTC AAG CAG GCT GAA TTT GAC ATC ATG TAC GGC
N K V A P F K Q A E F D I M Y G

918 GAA GGT ATT TCC CGT CTG GGC GAA ATC ATT GAG TTG GGT ACA AAT TTG AAA
E G I S R L G E I I E L G T N L K

969 CTG GTT GAG AAA TCA GGT GCG TGG TAC AGC TAC AAC GGT GAA AAA ATC GGC
L V E K S G A W Y S Y N G E K I G

1020 CAG GGT AAA GAA AAC GCT AAA GAG TTC CTG CGC GAG AAT CCA GCG ATT GCG
Q G K E N A K E F L R G A N P A I A

1071 GCA GAA ATT GAA GCC AAG ATT CGC GAC AAC TCT AAT GTG CTG GCA GAT AGC
A E I E A K I R D N S N V L A D S

1122 ATG ACT GCG GCC AGA AGT GAG GAC GAT TAA GCA GCT TGC GCC AGC CGA TTG
M T A A R S E D * A G T G C C C A T T

1173 AAA AGT CTC TGC GTC AGC GTG CGC TGG AGT ATT TGA GCA AGC GGG AAT ATT

1224 CTG CGG TCG AAT TGG CGC AAA AGC TT

Abb. 5

Nukeotidsequenz des 1.25 kb großen *M.clara* DNA-Fragmentes. Die Abbildung zeigt den nicht transkribierten Strang. Die Sequenz beginnt in Position 1 mit der EcoRI-Schnittstelle und endet in Position 1.249 mit der HindIII-Schnittstelle. Die Aminosäuren des offenen Leserahmens sind im Einbuchstabencode angegeben. Das vermutliche Translations-Startcodon ATG und das Terminationscodon TAA des *M.clara recA*-Genes ist kenntlich gemacht.

Die Sequenzierung dieses 1249 bp langen EcoRI-/HindIII-Fragmentes zeigte folgendes:

- (1) Das klonierte Fragment enthält einen 1101 bp umfassenden, offenen Leserahmen, der für 366 Aminosäuren kodiert.
- (2) Der vermutliche Translationsstart ist das 122 bp von der EcoRI-Schnittstelle entfernte ATG-Codon; das TAA-Terminations-Codon liegt 98 bp von der HindIII-Schnittstelle entfernt. Der kodierende Bereich des *M.clara recA*-Genes besteht daher vermutlich aus einer 1029 bp langen DNA-Sequenz, die für ein 342 Aminosäuren großes Protein kodiert.
- (3) Der Vergleich der Nukleotid- sowie der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen dieses *M.clara*-Gens mit den bisher veröffentlichten Sequenzen der *recA*-Gene von *E.coli*- und *Pseudomonas aeruginosa* (siehe Kapitel V., Diskussion) weist eindeutig darauf hin, daß es sich bei dem klonierten Gen um das *recA*-Gen von *Methylobacterium clara* handelt. Eine eingehende Analyse der Nukleotid- und Aminosäuresequenz erfolgt in Kapitel V, Diskussion.

D) Nachweis der Expression des *recA*-Genes in *E.coli*

Durch die Klonierung des *M.clara*-Fragmentes in einem *E.coli* Expressionssystem sollte gezeigt werden, daß der 1029 bp große, offene Leserahmen dieses Fragmentes tatsächlich exprimiert wird.

1. Genüberexpression in *E.coli*

Zur Überexpression des *recA*-ähnlichen *M.clara*-Gens wurde das von Tabor und Richardson (1985) entwickelte T7-RNA-Polymerase-Expressionssystem verwendet. Dieses aus zwei Plasmiden bestehende

System erlaubt die spezifische Überexpression von Genen, die hinter einem T7-RNA-Polymerase-spezifischen Promotor kloniert werden.

Das Plasmid pGP1-2 (7.2 kb) kodiert neben einer Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin und neben dem hitzelabilen *Lambda*-Repressor cI857 das unter der Kontrolle des *Lambda* P_i-Promotors stehende Gen für die T7-RNA-Polymerase. Dadurch ist eine Überexpression heterologer Gene unter Kontrolle des ϕ 10 Promotors, der spezifisch von der T7-RNA-Polymerase erkannt wird, möglich. Durch die Zugabe des Antibiotikums Rifampicin, das die Transkription von Genen durch die RNA-Polymerase der *E.coli*-Wirtszelle, nicht jedoch die T7-RNA-Polymerase inhibiert, kann das Genprodukt eindeutig identifiziert werden.

Durch die Integration des 1.25 kb großen EcoRI-/HindIII-Fragmentes aus *M.clara* in die stromabwärts des 10-Promotors liegende, multiple Klonierungsstelle des Plasmids pT7-3 wurde der Hybridvektor pMCB7-3 konstruiert.

Das in der gleichen Orientierung auf diesem Vektor vorliegende β -Lactamase-Gen wird bei der Temperatur-induzierten Überexpression unter der Kontrolle des ϕ 10-Promotors ebenfalls durch die T7-RNA-Polymerase überexprimiert.

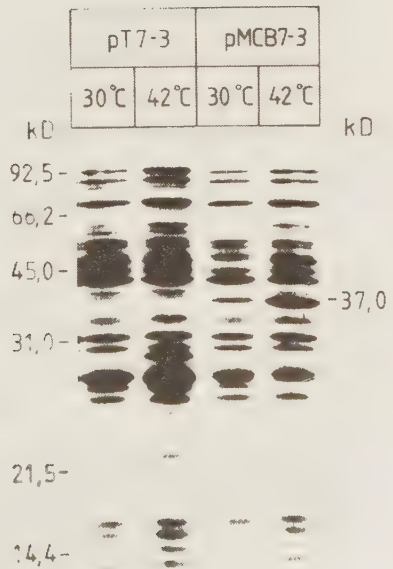


Abb. 6
Überexpression des *M.clara recA*-Genes in *E.coli*.
Coomassie-gefärbtes Polyacrylamid-Gel zur Auftrennung der bakteriellen Proteine. Die Größe des *M.clara* RecA-Proteins von 37 kD wurde durch Vergleich der mit einem Proteinstandard erhaltenen Peptidbanden ermittelt. Nach Induktion der T7-RNA-Polymerase wird das klonierte Gen deutlich überexprimiert.

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der aus induzierten und nicht-induzierten Bakterienkulturen stammenden Proteingesamt-Extrakte zeigte sich (Abb. 6):

- (1) Diejenigen *E.coli*-Stämme, die neben pGP1-2 den Vektor pMCB7-3 enthalten, weisen nach Induktion der T7-RNA-Polymerase-Aktivität ein zusätzliches Protein mit einer Größe von ca. 37 kD auf.
- (2) Das 37 kD Protein ist nicht auf die Transkription des auf dem Expressionsvektor ebenfalls vorhandenen β -Lactamase-Genes zurückzuführen: Bei der pT7-3-Kontrolle treten die drei bei Tabor und Richardson (1985) beschriebenen 29 kD- und 27 kD- β -Lactamase-Proteine sowie ein zusätzliches, kleineres Protein auf.
- (3) Nach Integration des 1.25 kb großen *M.clara*-Fragmentes zwischen den T7-RNA-Polymerase-Promotor ϕ 10 und das β -Lactamase-Gen werden die von dem β -Lactamase-Genabschnitt kodierten Proteine im Vergleich zur pT7-3 Kontrolle nur noch in geringem Maße gebildet.

2. Spezifische Protein-Markierung

Aufgrund der inhibierenden Wirkung des Antibiotikums Rifampicin auf die *E.coli*-RNA-Polymerase, nicht jedoch auf die T7-RNA-Polymerase, ist eine spezifische radioaktive Markierung aller unter Kontrolle dieser T7-RNA-Polymerase stehenden Gene möglich. Dieses wurde für die Markierung des RecA-ähnlichen *M.clara*-Proteins ausgenutzt.

Nach Induktion des T7-RNA-Polymerase-Gens (42°C) wurden die Zellen in Minimalmedium, dem bis auf Methionin und Cystein 18 unmarkierte Aminosäuren zugegeben worden sind, inkubiert. In Anwesenheit von Rifampicin werden nach Zugabe von ^{35}S -Methionin nur solche Proteine radioaktiv markiert, deren Gene durch die T7-RNA-Polymerase transkribiert werden.

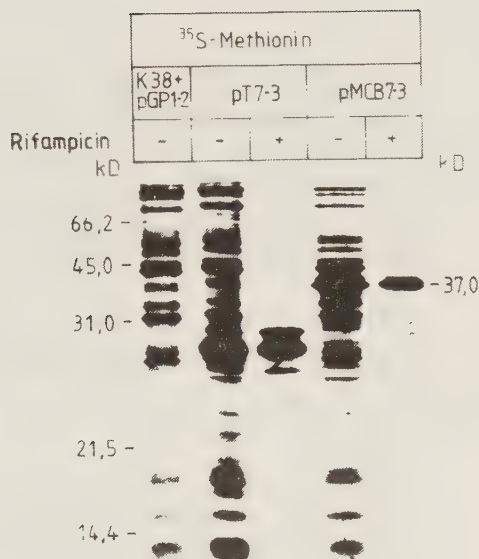


Abb. 7

Spezifische Markierung der Vektor-kodierten Proteine durch ³⁵S-Methionin.

Autoradiogramm der gelelektrophoretisch aufgetrennten Gesamtproteinextrakte, Hemmung der bakteriellen RNA-Polymerase durch Rifampicin-Zugabe führt zur spezifischen Markierung des 37 kD *M. clara* RecA-Proteins (pMCB7-3) bzw. des β -Lactamase-Proteins der pT7-3 Kontrolle.

Das in Abbildung 7 dargestellte Autoradiogramm der gelelektrophoretisch aufgetrennten Gesamtprotein-Extrakte belegt die bei den unmarkierten Proteinauftrennungen (s. Abschnitt 1) erhaltenen Ergebnisse.

D) Physiologischer Aktivitätsnachweis durch Komplementation

Zur Überprüfung der physiologischen Aktivität des isolierten *M. clara*-Genes wurde dieses nach Umklonierung in die bakteriellen Vektorplasmide pUC18 (pMCR10) bzw. pK18 (pMCR1) in den *recA*-negativen *E. coli*-Stamm HB101 eingeführt.

Diese Vektoren, die sich nur in der Art des Replikons und der selektierbaren Resistenzmarke unterscheiden, besitzen eine multiple Klonierungsstelle, die zwischen dem lac-Promotor und dem kodierenden Bereich für die ersten 146 Aminosäuren des β -Galactosidase-Gens (α -Peptid) angeordnet ist. Bei der Verwendung von *E. coli*-Wirtsstämmen, denen der entsprechende Operon-Bereich in der chromosomalen DNA fehlt, kann deren Deletion durch das

plasmidkodierte α -Peptid komplementiert werden. Eine Insertion von DNA-Fragmenten in die multiple Klonierungsstelle unterbindet diese Komplementation. Ein Testverfahren, das auf der β -Galactosidase-katalysierten Umwandlung des farblosen X-Gal in das blaue 5-Brom-4-Chlor-Indigo beruht, ermöglicht eine einfache Identifizierung der rekombinanten *E.coli*-Klone (Langley et al. 1975).

Unter Verwendung zweier Restriktionsendonukleasen ist zudem die Klonierung eines DNA-Fragmentes in einer erzwungenen Orientierung in Bezug zum lac-Promotor dieser Vektoren möglich.

In dieser *E.coli* *recA*-Mutante wurde das klonierte *M.clara*-Gen auf eine mögliche Komplementierung der durch die *recA*-Mutation des Wirtsstammes bedingten Sensibilität gegenüber UV-Strahlung hin untersucht.

Aufgrund der essentiellen Rolle des *E.coli* RecA-Proteins bei der Initiation der zelleigenen SOS-Reparaturmechanismen kann der *recA*-Genotyp eines Bakterienstammes durch die Überprüfung seines Verhaltens gegenüber DNA-schädigenden Agenzien festgestellt werden: RecA-positive Bakterienstämme weisen im Vergleich zu ihren *recA*-negativen Mutanten eine erheblich höhere Resistenz gegenüber UV-Strahlung und DNA-alkylierenden Agenzien (wie z.B. Methylmethanthiosulfonat, Mitomycin C) auf (Übersicht: Walker 1984). Diese Eigenschaft ist zur Klonierung der in Tabelle (3) aufgeführten *recA*-ähnlichen Gene verschiedener Bakterienarten durch Komplementierung von *E.coli* *recA*-Defekten ausgenutzt worden.

Die Bestimmung der jeweiligen Überlebensraten von *E.coli* RR1 (*recA*⁺), *E.coli* HB101 (*recA*⁻) sowie *E.coli* HB101 + Plasmid pMCR1 bzw. pMCR10 nach zunehmender UV-Strahlendosis zeigte folgendes Ergebnis (Abb. 8):

- (1) Das klonierte *recA*-ähnliche Gen aus *Methylomonas clara* ist in der Lage, die UV-Resistenz der *recA*⁻ *E.coli* Mutante HB101 teilweise wiederherzustellen: Die das *M.clara*-Gen tragenden HB101-Stämme weisen bei einer UV-Dosis von 20 J/m² im Vergleich zum HB101-Ausgangsstamm eine um den Faktor 1.000 erhöhte Resistenz gegenüber der DNA-schädigenden Strahlung auf.
- (2) Der Grad der Komplementierung führt nicht zum Erreichen der Resistenzwerte des *recA*-positiven *E.coli*-Stammes RR1.

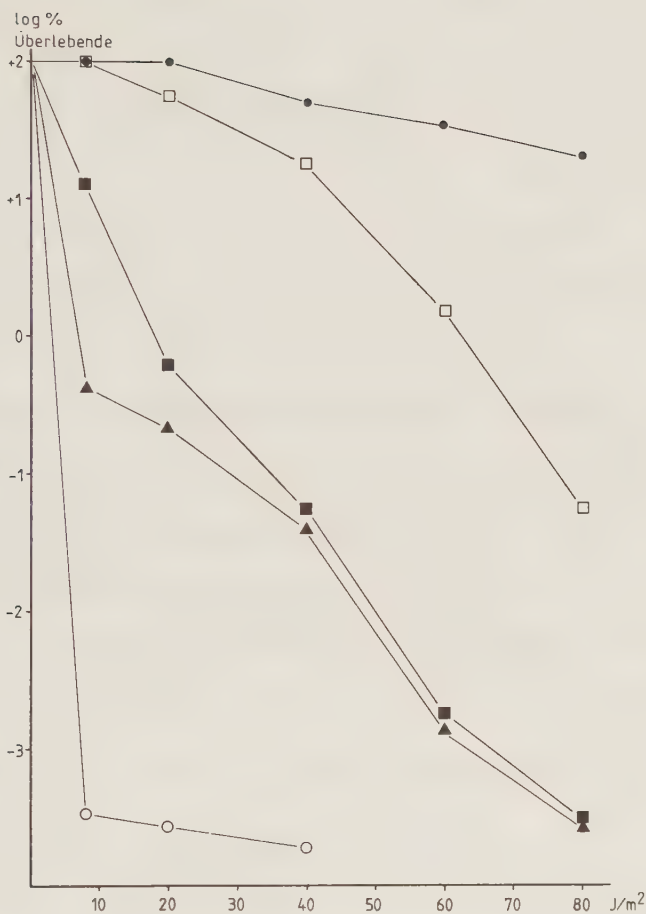


Abb. 8

Komplementierung der UV-Resistenz der *E. coli recA*-Mutante HB101 durch das klonierte *M. clara recA*-Gen.

Dargestellt ist die Überlebensrate (log % Überlebende) der unterschiedlichen *E. coli*-Kulturen nach UV-Bestrahlung mit zunehmender Dosis. Symbole: ● *E. coli* RR1 (*recA*⁺); ○ *E. coli* HB101 (*recA*⁻); □ *E. coli* HB101 + kloniertes *E. coli recA*-Gen; ■ *E. coli* HB101 + pMCR1; ▲ *E. coli* HB101 + pMCR10.

Die zur weiteren Kontrolle durchgeführte Bestimmung des UV-Resistenzverhaltens eines HB101-Stammes, der das (homologe) *E.coli recA*-Gen auf einem Vektor (pBR322 x pBT5) enthält, zeigt ebenfalls eine weniger stark ausgeprägte Resistenz als der Stamm RR1.

- (3) Die Verwendung unterschiedlich stark replizierender Vektoren zur Klonierung des *M.clara recA*-ähnlichen Genes führt nicht zu einem deutlich voneinander abweichenden Grad der Komplementation.

Damit ist gezeigt, daß das von dem klonierten *M.clara*-Fragment kodierte Protein in *E.coli* physiologisch aktiv ist. Dieser physiologische Funktionsnachweis beweist in Verbindung mit der durchgeführten Analyse der DNA-Sequenz und der Genüberexpression in *E.coli*, daß es sich bei dem klonierten Gen tatsächlich um das *recA*-Gen von *Methylomonas clara* handelt.

E) In vitro-Modifizierung des *M.clara recA*-Genes

Die *in vitro*-Inaktivierung eines Gens kann auf unterschiedliche Weise erfolgen:

- (1) durch Austausch einzelner Basenpaare, was entweder zur Bildung eines physiologisch inaktiven bzw. unvollständigen Proteins führt;
- (2) durch Deletion einzelner Genabschnitte bzw. Insertion zusätzlicher DNA-Sequenzen, wodurch der Leserahmen für das zuvor gebildete Genprodukt unterbrochen wird.

Die weitere Vorgehensweise zur Herstellung einer *M.clara recA*-Mutante erforderte die Inaktivierung des isolierten *recA*-Genes durch die Insertion eines DNA-Fragmentes, das eine in *M.clara* funktionierende Selektionsmarke besitzt.

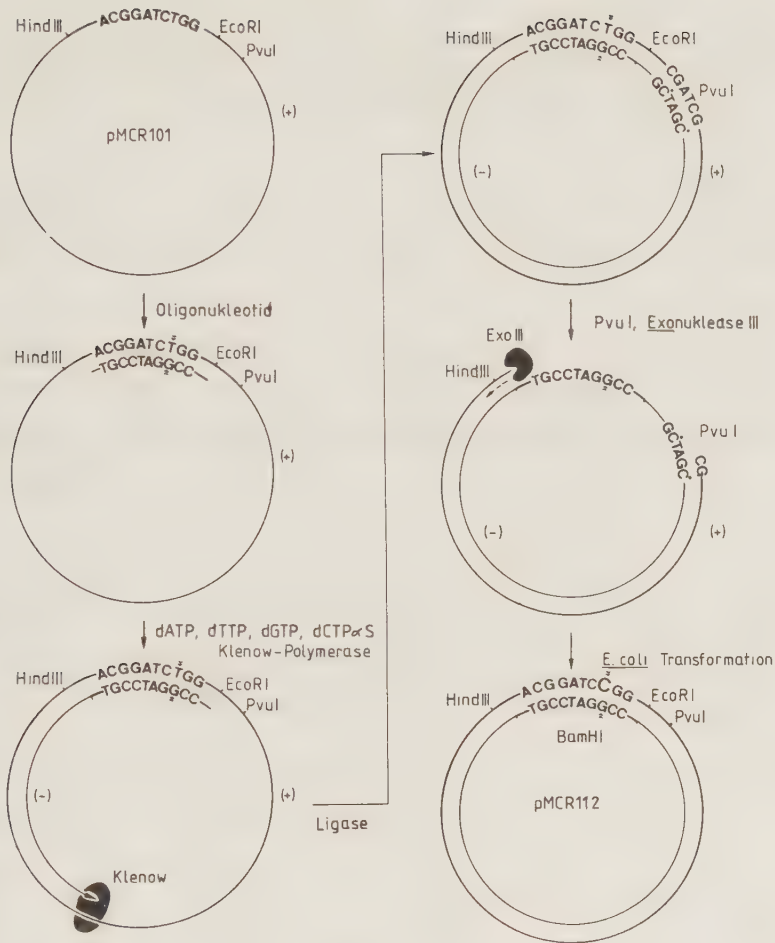


Abb. 9

Schematische Darstellung der *in vitro*-Mutagenese der pMCR101 DNA-Sequenzen nach der von Taylor et al. (1985 a,b) beschriebenen Methode. Beispielhaft ist hier die Transversion A/G in Position 702 des *M.clara recA*-Genfragmentes gezeigt, die zur Einfügung einer BamHI-Schnittstelle in die *recA*-Gensequenz führt.

Eine Mutante, die einen Defekt in ihrem *recA*-Gen aufweist, besitzt keinen selektionierbaren Vorteil im Vergleich zum *recA*-positiven Wildstamm. Voraussetzung zur späteren Selektion *recA*-negativer *M.clara*-Klone ist daher die Gegenwart einer mit der inaktivierten *recA*-Genkopie verbundenen, gut selektionierbaren Marke.

1. In vitro Mutagenese

Aus der ermittelten Nukleotidsequenz des *M.clara* EcoRI-/HindIII-Fragmentes wurden die Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen abgeleitet (siehe VIII. Anhang, Abb. 1). Innerhalb der *recA*-Gensequenz befinden sich danach keine Restriktionsschnittstellen, die sich für die Klonierung eines DNA-Fragmentes eignen. Durch ortsspezifische Mutagenesen wurden daher unter Verwendung mutierender Oligonukleotide an zwei Positionen BamHI-Schnittstellen in der DNA-Sequenz des *recA*-Genes eingeführt.

Die von Eckstein und Mitarbeitern (Taylor et al. 1985a,b; Nakamaye und Eckstein 1986) entwickelte Methode zur *in vitro*-Mutagenese ermöglicht neben der Insertions- und Deletionsmutagenese den gezielten Austausch einzelner Basenpaare unter Verwendung mutierender Oligonukleotide. Durch einen Strang-spezifischen Selektionsschritt wird die nicht-mutierte DNA-Sequenz *in vitro* entfernt. Auf diese Weise wird die wirtskodierte Reparatur der mutierten Sequenz verhindert, welche die Effizienz des Systems stark herabsetzen würde.

Das Prinzip der mit der einzelsträngigen pMCR101-DNA durchgeführten Mutagenese wird in Abbildung 9 am Beispiel des Austausches des Adenosins (Position 702 des *M.clara*-Fragmentes) gegen Guanosin schematisch dargestellt. Abbildung 10 zeigt einen Sequenzgel-Ausschnitt dieses mutierten Bereiches. Neben dieser Transition in Position 702 wurde eine Transversion in Position 250 (Cytidin durch Adenosin ersetzt) durchgeführt.

Durch diese ortsspezifischen Mutagenesen stehen somit zwei Vektoren mit mutierten *recA*-Genen, die jeweils eine BamHI-Schnittstelle aufweisen, sowie ein doppelt mutierter Vektor mit beiden BamHI-Schnitten für die nachfolgende Inaktivierung zur Verfügung (s. Tabelle 5).

Ausgangs-plasmid	Mutierendes Oligonukl.	Position der Mutation	Art der Mutation	Mutiertes Plasmid
pMCR 101	282	702	Transversion A → G	pMCR 112
pMCR 101	289	250	Transition C → A	pMCR 113
pMCR 112	289	250	Transition C → A	pMCR 114

Tab. 5
Ortsspezifische *in vitro*-Mutagenesen des Vektors pMCR101 zur Einführung von BamHI-Schnittstellen in die *M. clara recA*-Gensequenz. Sequenz der angegebenen Oligonukleotide in III. Material und Methoden. Die Positionsangabe bezieht sich auf die Lage in dem 1.25 kb großen *M. clara recA*-Genfragment. Grau unterlegt der Vektor pMCR112, der als Basis für die Herstellung des doppelt mutierten Vektors pMCR114 diente.

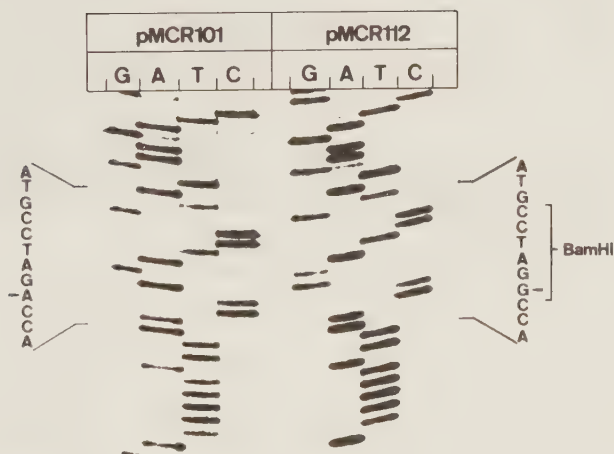


Abb. 10
Ortsspezifische *in vitro*-Mutagenese der *M. clara recA*-Gensequenz. Ausschnitt des Autoradiogramms eines DNA-Sequenzierungsgeles. Die Sequenz um die eingefügte BamHI-Schnittstelle ist herausgestellt, die ausgetauschte Base (A/G) durch einen Pfeil markiert.

2. Insertions-Inaktivierung

Zu den wenigen, bisher erfolgreich in *M. clara* angewendeten genetischen Marken zählen die Resistenzgene gegen das Antibiotikum Kanamycin. Daher bietet sich die Insertion der Kanamycin-Resistenzgen-Kassette aus dem Plasmid pUC4K (Vieira und Messing 1982) in die kodierende Sequenz des *recA*-Genes zu dessen Inaktivierung an.

Das in diesem Vektor klonierte, ursprünglich aus dem Transposon Tn903 stammende Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase-Gen vermittelt u.a. eine Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin (Oka et al. 1981, Vieira und Messing 1982). Durch die Verwendung der Enzyme BamHI, EcoRI, PstI und SalI kann es als Kassette aus dem pUC4K-Vektor herausgeschnitten werden.

Für die Insertion dieser Kanamycin-Resistenzgen-Kassette war zunächst die Umklonierung der modifizierten *M. clara* *recA*-Fragmente aus den Phagenvektoren in einen bakteriellen Plasmidvektor erforderlich.

Die mutierten EcoRI-/HindIII-Fragmente wurden aus den M13mp19-Derivaten pMCR112, pMCR113 und pMCR114 herausgeschnitten und in den Vektor pUC18 umkloniert. Die entsprechenden pUC18-Derivate erhielten die Bezeichnung pMCR12, pMCR13 und pMCR14.

Nach diesem Schritt wurden in die durch Mutagenese erzeugten BamHI-Schnittstellen jeweils die 1270 bp große Kanamycin-Resistenzgen-Kassette aus pUC4K kloniert. Die dabei erhaltenen Konstrukte pMCR12K, pMCR13K und pMCR14K (Abb. 11) unterscheiden sich grundsätzlich voneinander: Bei dem Konstrukt pMCR14K ist das 455 bp große Fragment zwischen den BamHI-Schnittstellen deletiert und durch das Kanamycin-Resistenzgen ersetzt worden. Im Vergleich dazu wird die *M. clara* *recA*-DNA-Sequenz bei den Konstrukten pMCR12K und pMCR13K ausschließlich durch die Integration des Kanamycin-Resistenzgenes in die singuläre BamHI-Schnittstelle unterbrochen.

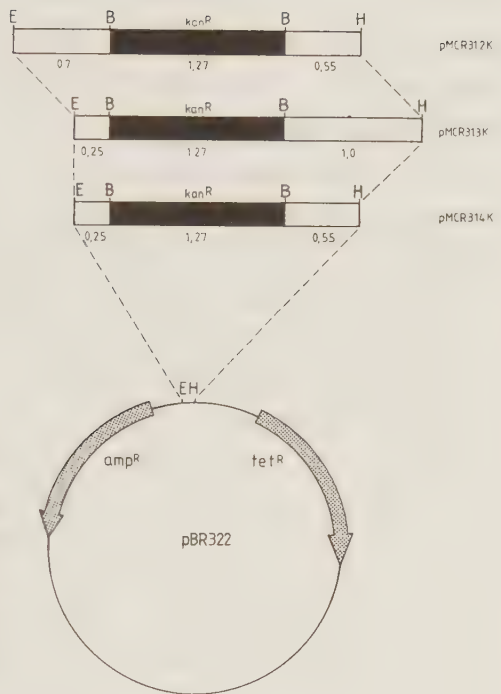


Abb. 11
Schematische Darstellung der Vektor-
konstrukte pMCR312K, pMCR313K und
pMCR314K. Diese Hybridvektoren enthal-
ten die unterschiedlich inaktivierten
M. clara recA-Genfragmente. Klonierung
der inaktivierten Genfragmente in die
EcoRI- (E) und HindIII- (H) Schnit-
stelle von pBR322. Schwarz unterlegt
die Kanamycin-Resistenzgen-Kassette.
Angabe der Größen in kb. Amp^R = Ampicillin-Resistenzgen, Tet^R = Tetracyclin-Resistenzgen.

F) Genaustausch in *Methylomonas clara*

Zur Inaktivierung des *recA*-Genes des *Methylomonas clara*-Stammes B45-BE1 muß die *in vitro*-modifizierte Genkopie wieder in die *M. clara*-Zelle eingeführt werden. Dies erfordert die Verwendung eines auf dieses methylotrophe Bakterium abgestimmten DNA-Übertragungssystems.

1. Konjugativer Gentransfer

Für *Methylobomonas clara* besteht bislang kein effizientes Transfektionssystem (Marquardt et al. 1984, Kües 1988). Daher wurde zur Übertragung der klonierten, inaktivierten *recA*-Genkopie in den *M. clara*-Stamm B45-BE1 auf ein von R. Marquardt (Frankfurt) entwickeltes Konjugationssystem zurückgegriffen.

Der konjugative Transfer eines Plasmids erfordert einen in *cis* vorhandenen Transferursprung (*oriT*), an dem die Transferreplikation initiiert wird. Zusätzlich zu diesem *incis* wirkenden Faktor ist die Gegenwart verschiedener *trans*-wirkender Funktionen notwendig. Diese sind u.a. für den Zell-/Zellkontakt und die Ausbildung des Konjugationspilus (*tra* = Transfer-Funktionen) sowie für die Transferreplikation des Plasmids in der Donor- und Rezipientenzelle und deren Regulation (*mob* = Mobilisierungs-Funktionen) verantwortlich (Übersicht bei Willetts 1988).

Die Transferfunktionen in diesem Übertragungssystem werden von dem IncP-1 Plasmid R751 (Meyer und Shapiro 1980, Thomas und Smith 1987) kodiert. Als Vektor zur Übertragung der modifizierten *recA*-Genkopien bietet sich das 4.3 kb große Plasmid pBR322 an, da es den in *cis* erforderlichen Konjugationsursprung (*oriT*) beinhaltet.

Da pUC18 nicht den für eine Mobilisierung notwendigen Konjugationsursprung trägt, wurden die *recA*-Gendervate in das Plasmid pBR322 umkloniert. Zur Isolierung der modifizierten *recA*-Genabschnitte wurden die Plasmide pMCR12K, pMCR13K und pMCR14K vollständig durch *EcoRI* und (aufgrund des in dem Kanamycin-Resistenzgen vorhandenen *HindIII*-Schnitts) partiell durch *HindIII* verdaut. Die drei unterschiedlichen *recA*-Fragmente wurden anschließend in *EcoRI*-/ *HindIII*-geschnittene pBR322-Moleküle kloniert, die entsprechend mit pMCR312K, pMCR313K und pMCR314K bezeichnet wurden (Abb. 11).

Die erforderlichen Mobilisierungsproteine, die von pBR322 nicht vollständig kodiert werden, stellt in diesem Konjugationssystem das nahe verwandte Helferplasmid ColK/Kan (R. Marquardt, Frankfurt) zur Verfügung.

Bei den durchgeführten triparentalen Konjugationsexperimenten wurden drei Bakterienstämme eingesetzt:

(1) *E. coli* CSH56 mit konjugativem Plasmid R751; (2) *E. coli* DH1 mit Helferplasmid ColK/Kan und dem zu mobilisierenden Vektor pMCR312K, pMCR313K oder pMCR314K; (3) *Methylobomonas clara* B45-BE1. Der eigentliche Donorstamm bildet sich erst während des Konjugationsablaufs durch den Übergang des Plasmids R751 in den Stamm DH1. In diesem erfolgt dann die Mobilisierung der Plasmide pMCR312K, pMCR313K und pMCR314K.

2. Selektion *recA*-negativer *M.clara*-Stämme

Die pBR322-Derivate pMCR312K, pMCR313K und pMCR314K (s. Abb. 11) besitzen keinen in *M.clara* funktionierenden Replikationsursprung und können deshalb nach ihrem konjugativen Transfer in die *M.clara*-Rezipientenzellen in diesen nicht replizieren.

Solche Vektoren, die nach Einbringen in einen neuen Wirt in diesem nicht stabil replizieren und deswegen in der Zelle nicht etabliert werden können, werden als Suizidvektoren bezeichnet (Winnacker 1985).

Nach der Beendigung des Konjugationsvorganges wurde eine Selektion auf Kanamycin-resistente *M.clara*-Transkonjuganten vorgenommen. Aufgrund der Replikationsunfähigkeit der übertragenen Vektoren sollten dabei nur Klone erhalten werden, bei denen homologe Rekombinationseignisse zwischen den in Vektor- und chromosomaler Wirts-DNA vorhandenen, identischen *recA*-Gensequenzen stattgefunden haben. Solche homologen Rekombinationsvorgänge führen nach doppelten Crossing-over-Ereignissen zu einem Austausch des nativen Genes durch die *in vitro*-modifizierte Gensequenz (s. V. Diskussion).

Die Selektion auf *M.clara recA*-Mutanten erfolgte nach Ausplattieren der Konjugations-Bakteriengemische auf *M.clara*-Medium, das mit Streptomycin und Kanamycin versetzt worden war. Durch die Zugabe von Streptomycin ist eine Selektion gegen die *E.coli*-Donorzellen möglich, die im Gegensatz zu dem eingesetzten *M.clara*-Stamm keine Resistenz gegen dieses Antibiotikum aufweisen. Bei den selektierten *M.clara* Transkonjuganten wurde eine mögliche "Verunreinigung" durch *E.coli*-Zellen durch Überprüfung des Wachstums auf dem *E.coli*-Medium L-Broth ausgeschlossen.

Insgesamt wurden nach diesen Konjugationsexperimenten ca. 1.300 Kanamycin-resistente *M.clara* Klone isoliert. 1.200 dieser Klone stammten aus über 50 Konjugationsexperimenten unter Verwendung des Konstruktes pMCR314K, während 100 Kanamycin-resistente *M.clara*-Klone aus insgesamt 12 Konjugationsexperimenten unter Verwendung der pMCR312K- bzw. pMCR313K-Vektoren hervorgingen.

3. Molekulare Analyse der *M.clara* *recA*-Mutanten

Zur Identifizierung von *M.clara*-Transkonjuganten, deren *recA*-Gen durch die inaktivierte Kopie ersetzt worden ist, wurden zunächst Koloniefilterhybridisierungen mit verschiedenen, radioaktiv markierten DNA-Sonden durchgeführt.

Kanamycin-resistente *M.clara*-Klone wurden parallel auf je zwei Nitrozellulose-Filtern angezogen. Nach der Lyse der Zellen und der Immobilisierung ihrer DNA auf dem Filter wurden diese in Hybridisierungsexperimenten eingesetzt:

Der erste der beiden identischen Filter wurde jeweils mit der radioaktiv markierten Kanamycin-Resistenzgen-Sonde hybridisiert, um zu bestätigen, daß die Resistenz der selektionierten *M.clara*-Zellen gegen Kanamycin auf die Übertragung dieses Gens zurückzuführen ist.

Die Wahl der zweiten DNA-Sonde war von dem mobilisierten Konstrukt abhängig: Dem Vektor pMCR314K fehlt das zentrale, 455 bp große Fragment zwischen den durch Mutagenese erzeugten BamHI-Schnittstellen innerhalb der *recA*-Gensequenz. Dieses aus dem Plasmid pMCR14 herausgeschnittene und gel-eluierte, interne *recA*-DNA-Fragment wurde bei pMCR314K-Transkonjuganten als Sonde eingesetzt: Bei einem Austausch des nativen *recA*-Gens gegen die inaktivierte Kopie des in die *M.clara*-Zelle eingeführten Vektors pMCR314K ist keine Hybridisierung mit dieser DNA-Sonde zu erwarten.

Da die Vektoren pMCR312K und pMCR313K die vollständige, lediglich durch die Kanamycin-Resistenzgen-Insertion unterbrochene *recA*-DNA-Sequenz enthalten, wurde in diesen Fällen radioaktiv markierte pBR322-DNA als Sonde verwendet. pBR322-DNA-Sequenzen sollte sich bei einem Genaustausch in der entsprechenden *M.clara*-Zelle nicht mehr nachweisen lassen.

Diese Koloniefilter-Hybridisierungsexperimente zeigten folgende Ergebnisse:

- (1) Alle der 1.200 auf diese Weise überprüften Kanamycin-resistenten pMCR314K-Transkonjuganten hybridisierten mit dem 455 bp großen, in dem Konstrukt pMCR314K deletierten *recA*-Teilfragment. Unter Verwendung dieses Konstruktes konnte demnach kein Austausch des *M.clara* *recA*-Gens nachgewiesen werden.
- (2) Unter den aus pMCR312K- und pMCR313K-Konjugationen hervorgegangenen Kanamycin-resistenten *M.clara*-Klonen wurden acht verdächtige Klone identifiziert, die keine Hybridisierung mit radioaktiv markierter pBR322-DNA zeigten.

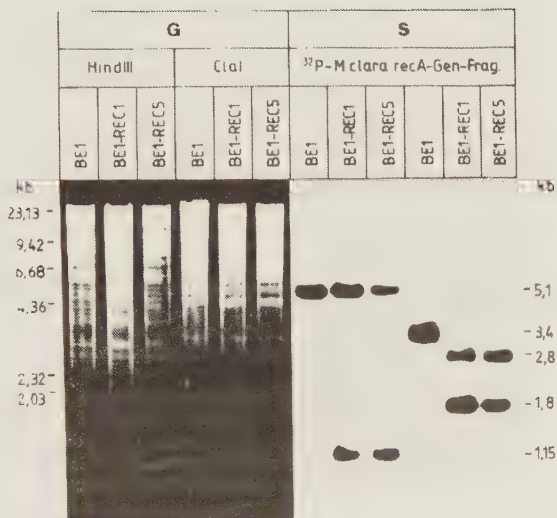


Abb. 12

Molekulare Charakterisierung der *M. clara* *recA*-Mutanten BE1- REC1 und BE1-REC5. Die durch HindIII bzw. ClaI geschnittene chromosomale DNA der *M. clara* *recA*-Mutanten und des Ausgangsstammes B45BE1 wurde gegen das 1.25 kb große *M. clara* *recA*-Genfragment hybridisiert. Deutlich zu erkennen die abweichenden Signale der *recA*-Mutanten. Weitere Einzelheiten im Text. G = Gelphoto, S = Southern-Hybridisierung.

Zur eingehenderen Analyse wurde aus zwei dieser Transkonjuganten und dem Ausgangsstamm B45-BE1 die chromosomale DNA isoliert. Nach Verdauung der DNA durch die Restriktionsenzyme ClaI und HindIII sowie gelelektrophoretischer Auftrennung der erhaltenen Fragmente wurden Southern-Hybridisierungen mit dem aus dem Vektor pMCR10 isolierten, 1.25 kb großen *recA*-Genfragment durchgeführt.

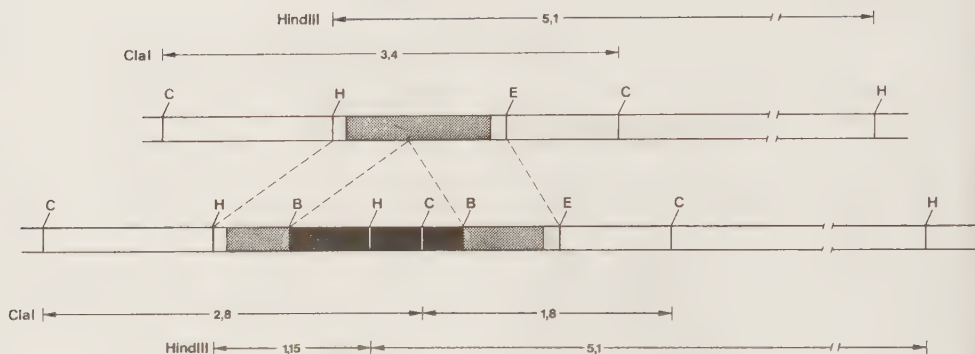


Abb. 13

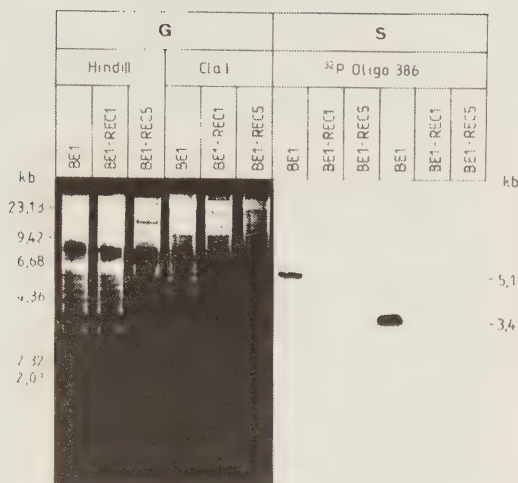
Organisation des *recA*-Genbereiches in der chromosomalen DNA des *M. clara*-Stammes B45-BE1 (oben) und seiner *recA*-Mutanten BE1-REC1 und BE1-REC5.

Die Größe der einzelnen HindIII- (H) und ClaI- (C) Fragmente vor und nach dem Genaustausch ist in kb angegeben. Durch die Existenz jeweils einer HindIII- und ClaI-Schnittstelle innerhalb der schwarz unterlegten Kanamycin-Resistenzgen-Kassette führt zur Bildung von jeweils zwei chromosomalen Fragmenten, die *recA*-Gensequenzen (grau unterlegt) enthalten (vgl. mit Hybridisierungsdaten Abb. 12). E = EcoRI.

Der Vergleich der bei diesen Hybridisierungen erhaltenen Signale (s. Abb. 12) mit den nach der Kartierung des *recA*-Genbereiches zu erwartenden Hybridisierungsdaten (s. Abb. 13) belegt, daß bei den zwei untersuchten *M. clara*-Stämmen, die die Bezeichnung BE1-REC1 und BE1-REC5 erhalten haben, ein Austausch des *recA*-Genes stattgefunden hat: Diese Mutanten weisen nur die durch die Insertion der Kanamycin-Resistenzgen-Kassette inaktivierte *recA*-Genkopie auf.

Abb. 14
Molekulare Charakterisierung der *M. clara* *recA*-Mutanten BE1-REC1 und BE1-REC5.

Auftrennung der chromosomalen *M. clara*-DNA wie bei Abb. 12. Die Hybridisierung der radioaktiv markierten Oligonukleotid 386 Sonde nur mit der BE1-DNA belegt zusätzlich den Austausch des *recA*-Genes (weitere Einzelheiten im Text).



Zur zusätzlichen Überprüfung dieses Ergebnisses wurden weitere Hybridisierungsexperimente mit dem 5'-markierten Oligonukleotid 386 vorgenommen. Dieses 17mer weist eine komplementäre Sequenz zu dem *recA*-Genbereich auf, der durch die Insertion der Kanamycin-Resistenzgen-Kassette genau in der Mitte der (Oligonukleotid-) Sequenz geteilt wird.

Abb. 14 zeigt, daß entsprechend der Erwartung dieses Oligonukleotid mit dem *recA*-Fragment der chromosomalen *M. clara*-BE1-DNA und der klonierten *recA*-Gen-Kontrolle hybridisiert. Die beiden analysierten *recA*-Mutanten BE1-REC1 und -REC5 weisen jedoch nicht mehr die für eine Hybridisierung unter den stringenten Bedingungen ausreichende, 17 bp lange Komplementärsequenz auf.

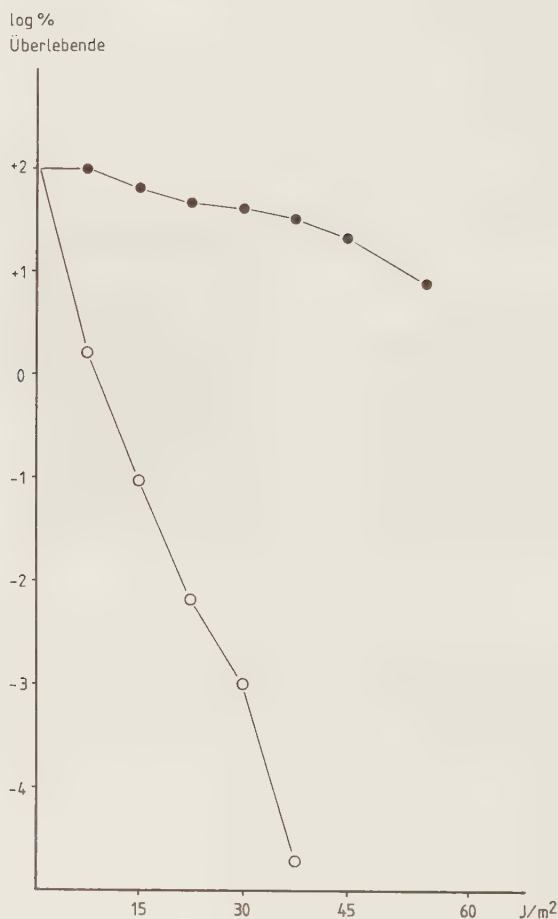


Abb. 15

Physiologischer Nachweis der *M. clara* *recA*-Gen Mutationen durch Untersuchung des UV-Resistenzverhaltens der *M. clara*-Stämme B45BE1 und BE1-REC1 und BE1-REC5.

Bestimmung der Überlebensrate (log % Überlebende) nach UV-Be-strahlung der *M. clara*-Kulturen mit zunehmender Dosis. Die *recA*-Mutantenstämme BE1-REC1/BE1-REC5 (○) weisen eine wesentliche niedrigere UV-Resistenz auf als der *recA*⁺ B45BE1-Stamm (●). BE1-REC1 und BE1-REC5 zeigen eine identische Sensibilität gegenüber UV-Strahlung.

G) Physiologischer Nachweis der *M.clara* *recA*-Gen-Inaktivierung

Neben dem Nachweis des erfolgreichen Genaustausches durch die Restriktions- und Hybridisierungsanalyse sollte zusätzlich der physiologische Effekt dieser *recA*-Mutationen gezeigt werden. Durch die Überprüfung des Resistenzverhaltens des *M.clara*-Stammes B45-BE1 gegen UV-Bestrahlung im Vergleich zu den *recA*-negativen *M.clara*-Mutanten wurde eine der physiologischen Auswirkungen einer solchen *recA*-Mutation nachgewiesen (s. Abb. 15): Die *recA*-negativen *M.clara*-Stämme weisen eine stark herabgesetzte Resistenz gegenüber der DNA-schädigenden UV-Strahlung auf. Bei einer UV-Dosis von 20 J/m^2 sind die *recA*-Mutanten ca. 10^4 mal empfindlicher gegenüber dieser Strahlung.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß der Austausch des nativen *recA*-Genes gegen *in vitro*-inaktivierte Genkopien zu der gewünschten Konstruktion der *Methylomonas clara*-Mutanten geführt hat. Diese Genaustauschvorgänge wurden nur mit solchen Vektorkonstrukten erhalten, die noch die vollständige, lediglich durch die Integration eines zusätzlichen DNA-Fragmentes inaktivierte *recA*-Gen-Sequenz besitzen.

V. Diskussion

Rekombinationsdefiziente Wirtsstämme sind sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die Anwendung in biotechnologischen Prozessen von großem Interesse. Untersuchungen von *E.coli* *recA*-Mutanten durch Clark und Marquies (1965) sowie Clark (1973) haben gezeigt, daß Mutationen im *recA*-Gen der bakteriellen Zelle zu einem vollständigen Verlust der Fähigkeit zur homologen Rekombination führen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, das Vorkommen eines *recA*-ähnlichen Genes in dem methylo trophen Bakterium *Methylo monas clara* nachzuweisen und dieses nach Charakterisierung und anschließender *in vitro*-Modifizierung zur Konstruktion einer *M.clara recA*-Mutante einzusetzen.

A) Isolierung und Identifizierung des *M.clara recA*-Genes

In den letzten Jahren sind in einer Reihe von Bakterien und Cyanobakterien Gene identifiziert worden, die für *E.coli* *RecA*-ähnliche Proteine kodieren (Tab. 6). Diese Proteine weisen bezüglich ihrer Funktion und einzelner, spezifischer Domänen einen hohen Konservierungsgrad auf (Keener et al. 1984, Knight et al. 1988).

Diese große, funktionelle Ähnlichkeit der *RecA*-Proteine wurde in fast allen Fällen zur Isolierung der entsprechenden, *recA*-ähnlichen Gene ausgenutzt (s. Tab. 6): Durch Komplementation von *E.coli* *recA*-Gen-Defekten wurden durch Überprüfung des UV-Resistenzverhaltens diejenigen Klone in Plasmid- bzw. Cosmid-Genbanken identifiziert, bei denen die klonierten heterologen DNA-Sequenzen für ein *RecA*-ähnliches Protein kodieren.

Neben den Gram-negativen Bakterien sind auch bei den Gram-positiven Bakterien *Bacillus subtilis* (Lovett und Roberts 1985) und *Streptococcus faecalis* (Yagi und Clewell 1980) *RecA*-ähnliche Protein-Funktionen nachgewiesen worden.

Bakterium	Isolierung	Hybridisierung	Referenz
<i>Aeromonas caviae</i>	Plasm./Kompl.	-	Resnick & Nelson 1988
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	" "	+	Miles et al. 1986
<i>Anabaena variabilis</i>	" "	n.b.	Owtrim & Coleman 1987
<i>Bacteroides fragilis</i>	" "	-	Goodman et al. 1987
<i>Erwinia carotovora</i>	" "	-	Keener et al. 1984
<i>Methylophilus methylotrophus</i>	" "	+	Finch et al. 1986
<i>Proteus mirabilis</i>	" "	n.b.	Eitner et al. 1981
<i>Proteus vulgaris</i>	" "	-	Keener et al. 1984
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO	" "	n.b.	Kokjohn & Miller 1985
<i>Rhizobium meliloti</i>	" "	+	Better & Helinski 1983
<i>Shigella flexneri</i>	" "	+	Keener et al. 1984
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	" "	n.b.	Ramesar et al. 1988
<i>Vibrio cholerae</i>	" "	n.b.	Goldberg & Mekalanos 1986
" "	" "	n.b.	Paul et al. 1986
" "	" "	-	Hamood et al. 1986
<i>Gloeocapsa alpicola</i>	Cosm./Kompl.	n.b.	Geoghegan & Houghton 1987
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	" "	-	Koomey & Falkow 1987
<i>Pseudomonas syringae</i>	" "	-	Hickman et al. 1987
<i>Methylomonas clara</i>	Lamb./Hybr.	+	Ridder, diese Arbeit
<i>Synechococcus</i> sp. PPC 7002	" "	+	Murphy et al. 1987

Tab. 6

Zusammenstellung der bisher klonierten Gene unterschiedlicher Bakterien-gattungen, die *recA*-ähnliche Proteine kodieren. Die Einordnung erfolgt nach der Vorgehensweise bei der Isolierung (Plasm. = Plasmidgenbank, Cosm. = Cosmidgenbank, Lamb. = *Lambda*-Genbank) und Identifizierung (Kompl. = Komplementation von *E.coli recA*-Gendefekten, Hybr. = Hybridisierung mit *E.coli recA*-Gen-sonde) der *recA*-ähnlichen Gene. Angegeben sind weiterhin Kreuzhybridisierungen der isolierten Gene mit dem *E.coli recA*-Gen (+ = positiv, - = negativ, n.b. = keine Hybridisierungsexperimente durchgeführt).

1. Identifizierung durch heterologe Hybridisierung

DNA-DNA-Hybridisierungsanalysen haben gezeigt, daß die *recA*-ähnlichen Gene verschiedener Bakterien trotz der Konservierung ihrer Genprodukte im Verlaufe der Evolution in ihrer Basensequenz stark verändert worden sind. Kreuzhybridisierungen wurden in der Regel nur bei nahe miteinander verwandten Bakterienarten beobachtet (Keener et al. 1984, Resnick und Nelson 1988). Anderer-

seits jedoch weisen die *recA*-ähnlichen Gensequenzen einzelner, evolutionär weiter entfernter Bakterien (wie *Methylophilus methylotrophus*, Finch et al. 1986, *Synechococcus* sp. PPC7002, Murphy et al. 1987) deutliche Ähnlichkeit zum *E.coli recA*-Gen auf.

Die Ergebnisse der Hybridisierungsexperimente der chromosomalen *Methylomonas clara*-DNA unter Verwendung einer *E.coli recA*-Gen-sonde weisen darauf hin, daß in diesem Bakterium ein stark konserviertes, *recA*-ähnliches Gen existiert.

Die im Vergleich zur homologen *E.coli*-Kontrolle nicht wesentlich schwächeren Hybridisierungssignale einzelner Fragmente der chromosomalen *M.clara*-DNA mit dem *E.coli recA*-Gen (Abb. 3) zeigen, daß das vermutete *recA*-ähnliche *M.clara*-Gen zumindest einzelne, stark konservierte DNA-Sequenz-Bereiche besitzt. Darüber hinaus weist die eindeutige Hybridisierung eines einzelnen (10.5 kb großen) *EcoRI*-Fragmentes darauf hin, daß das *recA*-ähnliche Gen nur in einer einzigen Kopie im *M.clara*-Genom vorhanden ist.

Die starken, spezifischen Hybridisierungen der *E.coli recA*-Gensonde mit dem *M.clara*-Genom ermöglichten die Isolierung des vermutlichen *M.clara recA*-Genes aus einer Genbank, die in dem *Lambda*-Vektor EMBL4 angelegt wurde.

Anfängliche Versuche, das *M.clara recA*-Gen durch Komplementationstests mit Hilfe einer Cosmid-Genbank zu klonieren, wurden aufgrund der beobachteten, starken Instabilität der rekombinanten Cosmidvektoren nicht weiter verfolgt.

In ähnlicher Weise wie bei der in dieser Arbeit beschriebenen Isolierung des *M.clara recA*-Genes ist nur bei der Klonierung des entsprechenden Genes aus dem Cyanobakterium *Synechococcus* sp. Stamm PPC 7002 (Murphy et al. 1987) vorgegangen worden. Diese Autoren isolierten das *recA*-ähnliche *Synechococcus*-Gen aus einer *Lambda*-Genbank durch Hybridisierung mit einem zentralen, stark konservierten *E.coli recA*-Gen DNA-Abschnitt.

2. Das *M.clara* *recA*-Gen und die *recA*-Gene von *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* sind stark konserviert.

Die Sequenzierung des aus der *Lambda*-Genbank isolierten, mit der heterologen *recA*-Sonde hybridisierenden *M.clara*-DNA-Fragmentes zeigt, daß die vollständige kodierende *recA*-Gensequenz in diesem DNA-Fragment enthalten ist (s. Abb. 5).

Neben der Sequenz dieses *M.clara* *recA*-Genes sind bisher nur die *recA*-Gensequenzen von *Escherichia coli* (Horii et al. 1980, Sancar et al. 1980) und *Pseudomonas aeruginosa* PAO (Sano und Kageyama 1987) vollständig ermittelt worden. Der Vergleich der bei diesen Sequenzanalysen erhaltenen Daten (Tab. 7) zeigt, daß das *M.clara* *recA*-Gen mit einer Länge von 1029 bp, die für 342 Aminosäuren kodieren, geringfügig kleiner ist als das entsprechende *E.coli*- und *P.aeruginosa*-Gen. Die aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten Molekulargewichte der *recA*-Genprodukte weisen eine dementsprechend große Übereinstimmung auf. Der für das *M.clara*-Gen ermittelte AT-Gehalt liegt mit 47.7% höher als der für die vergleichbaren *E.coli*- (45.8% AT) und *P.aeruginosa*- (35.9% AT) Gene.

Das *M.clara* *recA*-Gen stellt das bislang erste, vollständig sequenzierte Gen dieses methylo-trophen Bakteriums dar. Daher kann der in diesem Gen festgestellte AT-Gehalt nicht mit dem anderer *M.clara*-Gene verglichen werden. Grundsätzlich deuten die ersten Sequenzdaten auf einen ähnlichen AT-Gehalt der Genome von *M.clara* und *E.coli* hin. Der AT-Gehalt des *Pseudomonas aeruginosa* *recA*-Genes entspricht weitgehend dem durchschnittlichen AT-Gehalt des *P.aeruginosa* PAO -Genoms (32.8% AT, Krieg und Holt 1985).

Der Vergleich der DNA- und Aminosäuresequenzen des *M.clara* *recA*-Genes mit denen des *E.coli*- und *P.aeruginosa*-Genes zeigt, daß diese Gene stark konserviert sind (Tab. 8). Das *M.clara* *recA*-Gen weist mit 69.7% auf DNA- und 75.2% auf Proteinebene eine größere Ähnlichkeit zum *P.aeruginosa*- als zum *E.coli*-*recA*-Gen (67.7% DNA-, 72.3% Proteinebene) auf. Unter Berücksichtigung der Substi-

	Länge	AT-Gehalt	Leserahmen	Molekulargewicht (theoretisch)
M.clara	1029 Bp	47.7 %	342 AS	36.579 Dalton
E.coli	1062 Bp	45.8 %	353 AS	37.931 Dalton
P.aeruginosa	1041 Bp	35.9 %	346 AS	36.837 Dalton

Tab. 7

RecA-Gene von *Methylomonas clara*, *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*. Vergleich der Primärstrukturen der *recA*-Gene und der aus den Nukleotidsequenzen abgeleiteten RecA-Proteine.

	M.clara	P.aeruginosa	E.coli	PROTEINE
M.clara		75.2 %	72.3 %	
P.aeruginosa	69.7 %		70.8 %	
E.coli	67.7 %	71.5 %		

D N A

Tab. 8

Vergleich der Ähnlichkeit der *recA*-Gene und ihrer Genprodukte von *Methylomonas clara*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli*. Die Angaben beziehen sich auf den Prozentsatz der Nukleotide bzw. Aminosäuren an identischen Positionen.

tution ähnlicher Aminosäuren (konservative Austausche, Miyata et al. 1979) sind 84.2% (*M.clara*/ *P.aeruginosa*) bzw. 79.8% (*M.clara*/ *E.coli*) der Aminosäuresequenzen dieser Gene zueinander "homolog".

Bei der Verwendung des Begriffes "Homologie" muß berücksichtigt werden, daß dieser eine Abstammung der unterschiedlichen DNA-Sequenzen voneinander postuliert, die nicht nachgewiesen ist. In Anlehnung an Reeck et al. (1987) wird daher in der Regel der Begriff "Ähnlichkeit" verwendet. Die auffallend starke Konservierung der *recA*-Gene und der von ihnen kodierten Proteine macht jedoch eine direkte verwandtschaftliche Beziehung dieser DNA-Sequenzen wahrscheinlich.

Der direkte Vergleich (Abb. 16) der aus den drei bisher sequenzierten *recA*-Genen abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigt, daß einige Bereiche dieser Proteine eine völlige Übereinstimmung aufweisen. Lediglich die carboxyterminalen Protein-Bereiche und ein ca. 10 Aminosäuren großer Abschnitt in der Nähe des aminoterminalen Bereiches der Proteine unterscheiden sich deutlich voneinander.

Diese hohe Konservierung der Proteinstrukturen könnte ein Hinweis darauf sein, daß Konformationsänderungen des RecA-Proteinmoleküls nur begrenzt mit seinen verschiedenen essentiellen Funktionen kompatibel sind.

In dem multifunktionalen *E.coli* RecA-Protein sind durch die strukturelle und funktionelle Analyse von Mutanten einzelne Domänen nachgewiesen worden (Kawashima et al. 1984, Wang und Tessman 1985, Ogawa und Ogawa 1986). Eine Reihe einzelner Aminosäuren, deren essentielle Bedeutung für Teilfunktionen des *E.coli* RecA-Proteins gezeigt wurde, sind sowohl im *M.clara*- als auch im *P.aeruginosa*- RecA-Protein konserviert.

Der Austausch von Gly¹⁶⁰ gegen Asp führt zu einem Verlust aller Funktionen des *E.coli* RecA-Proteins; Gly²⁰⁴ und Gly²²⁹ sind für die Erkennung von Repressoren, Val²⁴⁶ und Ileu²⁹⁸ für die Thermostabilität des Proteins verantwortlich (Kawashima et al. 1984, Wang und Tessman 1985, Ogawa und Ogawa 1986). Die *M.clara*- und *P.aeruginosa*- RecA-Proteine weisen an diesen Positionen identische Aminosäuren auf (s. Abb. 16).

In einigen Bereichen sind die drei miteinander verglichenen RecA-Aminosäuresequenzen vollkommen identisch. Dies ist ein Hinweis darauf, daß diese Proteinabschnitte für spezifische Funktionen der RecA-Proteine verantwortlich sind.

Die Gly⁶³-Thr⁷² Region des *E.coli* RecA-Proteins ist identisch mit den entsprechenden Regionen der *M.clara*- und *P.aeruginosa*-Proteine. Diese Aminosäuresequenz weist eine große Ähnlichkeit auf mit der Konsensus-Sequenz, die bei anderen ATP-bindenden Proteinen nachgewiesen worden ist (Walker et al. 1982, Higgins et al. 1985, Gill et al. 1986).

Andererseits lassen sich aber auch deutliche Unterschiede in einigen Aminosäure-Positionen feststellen, für die beim *E.coli* RecA-Protein eine essentielle Funktion nachgewiesen worden ist. Als Beispiel sei hier die Asp³²-Glu³⁸ Region des *E.coli* RecA-Proteins aufgeführt, die eine Bedeutung für die Regulierung der Proteaseaktivität des Proteins besitzt: Die *M.clara* und *P.aeruginosa* RecA-Proteine weisen in diesem Bereich eine vollkommen unterschiedliche Aminosäuresequenz auf (Abb. 16).

Weiterhin kann eine Substitution des für die ATPase-Aktivität des *E.coli* RecA-Proteins wichtigen Cys¹¹⁶ (Kuramitsu et al. 1984) in den entsprechenden *M.clara*- und *P.aeruginosa*-Proteinen beobachtet werden.

Die carboxyterminalen Bereiche der analysierten RecA-Proteine sind in ihrer Aminosäuresequenz ebenfalls völlig verschieden. Die vergleichende Darstellung der berechneten Hydropathiewerte (Abb. 17) verdeutlicht jedoch, daß der jeweilige terminale Bereich dieser Proteine einen überwiegend hydrophilen Charakter besitzt.

Aus der Verteilung hydrophiler und hydrophober Aminosäuren innerhalb eines Proteins können Hinweise auf die Struktur abgeleitet werden (Kyte und Doolittle 1982, Eisenberg 1984). Unterschiedliche Domänen lassen sich in sog. Hydropathieprofilen graphisch darstellen.

Dieser Befund ist unter dem Gesichtspunkt von Interesse, daß von Ogawa und Ogawa (1986) eine Beteiligung des carboxyterminalen Proteinabschnittes an der Regulation der Protease-Aktivität des *E.coli* RecA-Proteins nachgewiesen worden ist.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß die *recA*-Gene von *M.clara*, *E.coli* und *P.aeruginosa* eine große Übereinstimmung in ihren Nukleotid- und Aminosäuresequenzen aufweisen. Einzelne Aminosäuren und Domänen, die bei dem *E.coli* RecA-Protein mit spezifischen Funktionen in Verbindung gebracht werden, sind teilweise stark konserviert.

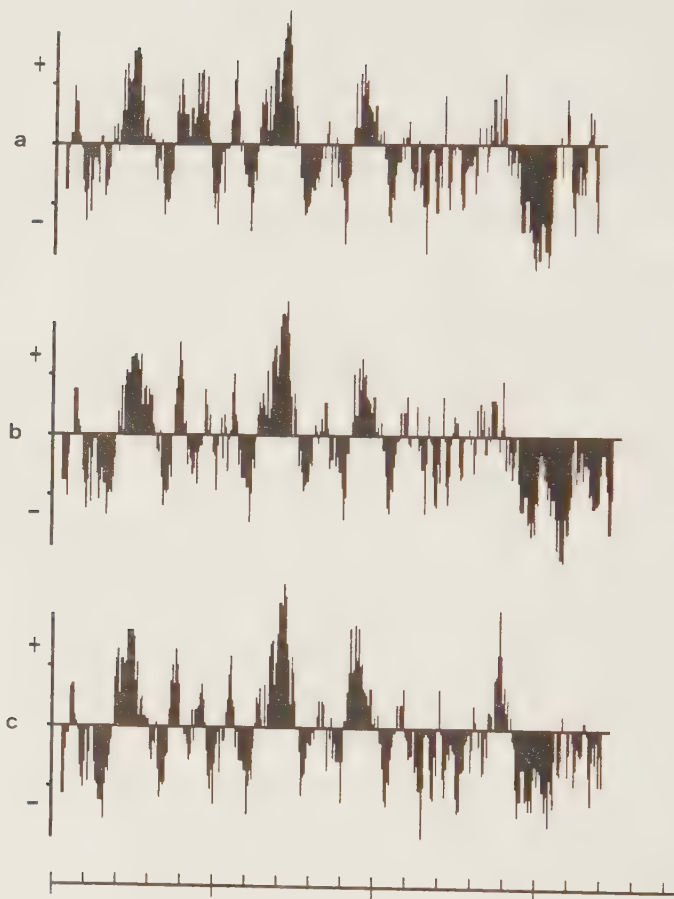


Abb. 17
Hydropathieprofile der RecA-Proteine von *Methylobacterium clara* (a), *Escherichia coli* (b) und *Pseudomonas aeruginosa* (c). Die Berechnung der Profile erfolgte durch Mittelwertbildung von jeweils 11 Hydropathiewerten (Kyte und Doolittle 1982). Hydrophile Domänen (s. carboxyterminale Enden der Proteine) entsprechen negativen Werten. Zur Analyse wurde ein Computerprogramm von Th. Karsch (Kundl) verwendet.

B) Analyse von Expressionssignalen des *M.clara* *recA*-Genes

Über die Transkriptions- und Translationssignale für die Genexpression bei *Methylomonas clara* ist nur wenig bekannt. Bislang sind nur Untersuchungen eines Promotorbereiches des nativen *Methylomonas clara*-Plasmides pBE3 durchgeführt worden (Metzler et al. 1988). Die dort isolierten (überlappenden) Promotoren weisen Strukturen auf, die den bei *E.coli* identifizierten Promotoren stark ähneln. Der entsprechende Sequenzabschnitt kann zu einer hypothetischen Sekundärstruktur aufgefaltet werden, wie sie auch für *E.coli*-Promotorstrukturen beschrieben ist.

Der 5'-Bereiches des *M.clara* *recA*-Genes (Abb. 18a) zeigt keine eindeutigen Übereinstimmungen mit den Konsensus-Sequenzen (-10, -35 Region) charakteristischer *E.coli*-Promotoren (Beschreibung von typischen *E.coli* Promotoren bei Hawley und McClure 1983). Ebenfalls ist keine auffallende Ähnlichkeit zu den Promotorsequenzen des *M.clara*-Plasmides pBE3 (Metzler et al. 1988) festzustellen.

Obwohl die typischen -10 und -35 Regionen bakterieller Promotoren nicht direkt identifiziert werden können, läßt sich eine Sekundärstruktur in dem 5'-Bereich des *M.clara* *recA*-Genes auffalten, die Ähnlichkeiten zu der von Metzler et al. (1988) beschriebenen Struktur aufweist (Abb. 18b). Im Einzelstrangbereich dieser hypothetischen Sekundärstruktur ist eine Region vorhanden, die eine der -10 Region ("Pribnow Schaller Box", Konsensus-Sequenz TATAAT) ähnliche Sequenz besitzt. Hinsichtlich ihrer Lage in der Sekundärstruktur könnte es sich tatsächlich um die -10 Region handeln. In Abb. 18 b ist entsprechend die -35 Region markiert, die sich allerdings in ihrer Sequenz von vergleichbaren *E.coli*- und *M.clara*- Regionen stark unterscheidet.

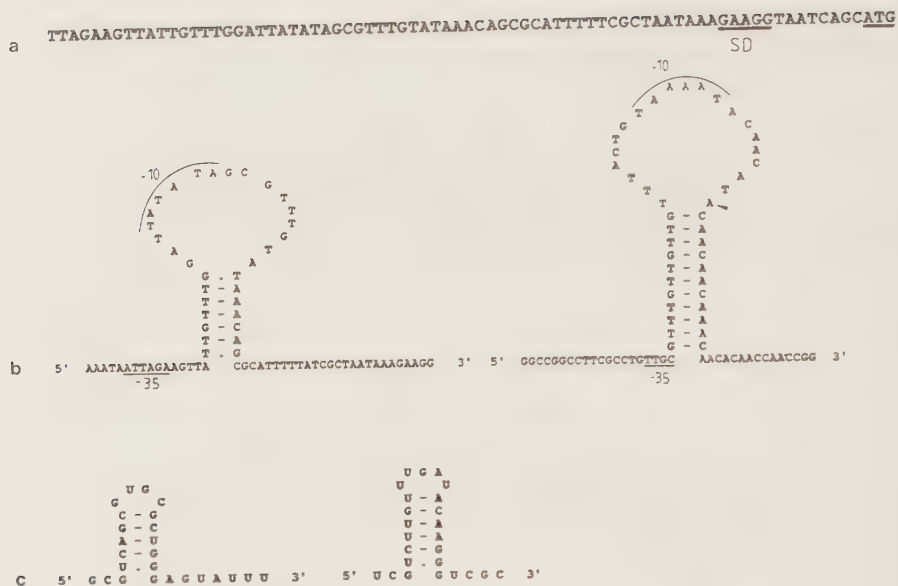


Abb. 18

Analyse von Expressionssignalen des *M.clara recA*-Genes.

- Teil der Nukleotidsequenz des 5'-Bereiches des *recA*-Genes, am rechten Ende mit dem vermutlichen Translations-Startcodon ATG beginnend. SD = Shine-Dalgarno-Sequenz (Ribosomenbindungsstelle).
- Mögliche Sekundärstruktur der Promotor-Region des *M.clara recA*-Genes (links) verglichen mit der von Metzler et al. (1988) beschriebenen Struktur einer Promotorregion des *M.clara* Plasmides pBE3. Hypothetische -10 und -35 Regionen sind gekennzeichnet.
- Mögliche Terminatorstruktur im 3'-Bereich des *M.clara recA*-Genes (links) im Vergleich zu der von dem *E.coli recA*-Gen bekannten Struktur (rechts).

Da das in dem *E.coli*-Vektor pUC18 klonierte *M.clara recA*-Gen in entgegengesetzter Orientierung zum Promotor des β -Galactosidase-Genes vorliegt, steht das *recA*-Gen vermutlich unter der Kontrolle eines eigenen Promotors. Eine solche als Promotor funktionierende

Struktur sollte daher innerhalb des 122 bp langen, klonierten 5'-Bereiches vorhanden sein. Eine eindeutige Identifizierung erfordert jedoch eingehende funktionelle Studien dieses DNA-Abschnittes (z.B. Bestimmung des Transkriptions-Startpunktes).

Im Gegensatz zu den nicht eindeutig identifizierbaren Transkriptionssignalen zeigt die Überprüfung der direkt vor dem vermutlichen Translations-Startcodon (ATG) liegenden DNA-Sequenz (Abb. 18a) die Existenz einer konservierten Ribosomenbindungsstelle. Diese vermutliche Shine-Dalgarno-Sequenz des *M.clara recA*-Genes ist identisch mit der entsprechenden Sequenz des 5'-Promotorbereiches des *M.clara* Plasmides pBE3 (Metzler et al. 1988). Zwischen der Shine-Dalgarno-Sequenz (GAAGG) und dem Translations-Startcodon (ATG) befinden sich jeweils acht Basenpaare.

Der 3'-Bereich des *M.clara recA*-Genes weist Strukturen auf, die möglicherweise als Transkriptions-Terminatoren wirken. Die in Abb. 18c gezeigte hypothetische Sekundärstruktur, die sich aus der *M.clara* DNA-Sequenz ergibt, ist z.B. der Terminator-Sekundärstruktur bei dem *E.coli recA*-Gen sehr ähnlich.

Die Überexpression des *M.clara recA*-Genes mit Hilfe des T7-RNA-Polymerase-Expressionssystems (s. IV. Ergebnisse, Abschn. C) gibt Hinweise darauf, daß im 3'-Bereich des *M.clara recA*-Genes starke Terminatorfunktionen vorhanden sein müssen: Durch Klonierung des *recA*-Genes zwischen die von der T7-RNA-Polymerase erkannte Promotorsequenz und der β -Lactamase-Gensequenz wird die Expression des β -Lactamase-Genes nahezu vollständig verhindert.

Der 122 bp umfassende, klonierte Teil des 5'-Bereiches des *M.clara recA*-Genes wurde auf die Existenz einer SOS-Box-ähnlichen DNA-Sequenz untersucht.

Als SOS-Box wird eine kurze, stark konservierte DNA-Sequenz im Promotorbereich einiger *E.coli*-Gene bezeichnet, die von dem an DNA bindenden LexA-Protein erkannt wird (Walker 1984). Dieses LexA-Protein wirkt als Repressor für eine Vielzahl von Genen, die an DNA-Reparaturvorgängen (SOS-Antwort) in der *E.coli*-Zelle beteiligt sind. Die Expression des *recA*-Genes wird ebenfalls durch diesen LexA-Repressor reguliert. Da das aktivierte RecA-Protein

die Spaltung des LexA-Proteines mit beeinflußt (Little 1984), reguliert das RecA-Protein die Expression des eigenen Gens (Übersicht bei Walker 1984, 1987).

Im Gegensatz zu dem *P.aeruginosa recA*-Gen, bei dem eine solche konservierte Struktur vorhanden ist (Sano und Kageyama 1987), können bei dem *M.clara recA*-Gen keine SOS-Box-ähnlichen DNA-Sequenzen nachgewiesen werden.

Der Grund für diese nicht identifizierbare SOS-Box könnte darin liegen, daß die Regulation des *recA*-Gens in *M.clara* nicht durch einen, dem LexA-Protein ähnlichen Repressor vorgenommen wird, bzw. daß ein solcher potentieller Repressor eine andere Erkennungssequenz besitzt. Eine weitere denkbare Erklärungsmöglichkeit wäre die Lokalisation einer solchen SOS-Box stromaufwärts des klonierten 5'-*recA*-Genbereiches bzw. eine Operon-ähnliche Genorganisation.

C) Expression des *M.clara recA*-Gens in *E.coli*

1. Das klonierte *Methylobacterium* *clara* DNA-Fragment kodiert für ein 37 kD großes Protein

Die Überexpression des identifizierten offenen Leserahmens in *E.coli* unter Verwendung des T7-RNA-Polymerase-Expressionssystems (Tabor und Richardson 1985) zeigt, daß ein 37 kD großes Protein von diesem *M.clara*-Gen kodiert wird. Die festgestellte Größe des überexprimierten Genproduktes stimmt mit dem aus der DNA-Sequenz abgeleiteten Wert (s. Tab. 7) für die Größe des *M.clara* RecA-Proteines überein. Die spezifische Markierung des gebildeten *M.clara* RecA-Proteins durch radioaktiv markiertes Methionin (s. Abb. 7) belegt die Überexpression dieses Gens in diesem System. Das *M.clara recA*-Gen stellt das erste, in *E.coli* exprimierte Gen aus diesem methylobakteriellen Bakterium dar. Diese Expressionsstudien zeigen, daß Gene aus *Methylobacterium* *clara* grundsätzlich in *E.coli* exprimiert werden können.

2. Das *M.clara recA*-Genprodukt komplementiert die *recA*-Mutation von *E.coli* HB101

E.coli recA-Mutanten weisen eine stark reduzierte Resistenz gegenüber UV-Strahlung auf, da in diesen Stämmen die Transkription der SOS-Gene nicht induziert werden kann.

Die Einführung von DNA-Schädigungen durch chemische (z.B. methylierende Substanzen) und physikalische (z.B. UV-Strahlung) Mutagene führt in der *E.coli*-Zelle zu der gesteigerten Expression von mehr als 17 bisher identifizierten, sog. *din* ("damage inducible") Genen, die Teil des SOS-Systemes sind (Zusammenstellung bei Walker 1987). Diese, durch das RecA-Protein regulierte SOS-Antwort der Bakterienzelle auf DNA-Schädigung äußert sich in dem erhöhten Vermögen, geschädigte DNA-Regionen durch Vorgänge der Exzisions- und postreplikativen Rekombinationsreparatur zu reparieren (Übersicht bei Walker 1984, 1987).

Diese regulatorische Funktion des RecA-Proteines in den Reparaturprozessen geschädigter DNA-Sequenzen wurde für den physiologischen Nachweis des *M.clara* RecA-Proteines ausgenutzt.

Die Überprüfung des Effektes, den die Einführung des *M.clara recA*-Genes in den *recA*-negativen *E.coli*-Stamm HB101 auf dessen UV-Resistenzverhalten hat, zeigt, daß das *M.clara recA*-Gen diese Teilfunktion des *E.coli recA*-Genes komplementieren kann.

Mit Hilfe einer solchen Komplementation einer Teilfunktion des *E.coli* RecA-Proteines ist die überwiegende Mehrheit der bisher beschriebenen, *recA*-ähnlichen Gene verschiedener Bakteriengattungen identifiziert worden (s. Tab. 6). Der festgestellte Grad der Komplementation des *E.coli recA*-Gendefektes durch das *M.clara recA*-Gen entspricht weitgehend dem für andere, *recA*-ähnliche Gene beschriebenen Werten (Literatur s. Tab. 6).

D) Austausch des nativen *M.clara recA*-Genes durch die *in vitro* inaktivierte Genkopie

Zur Herstellung der *M.clara recA*-Mutante wurden drei Hybridvektoren

ren konstruiert, die sich bezüglich der Inaktivierung des klonierten *M.clara recA*-Genes voneinander unterscheiden (s. IV. Ergebnisse, Abb. 11): Während bei den zwei Konstrukten pMCR312K und pMCR313K die Inaktivierung des *recA*-Genes nur durch die Integration der Kanamycin-Resistenzgen-Kassette erfolgte, weist das in pMCR314K enthaltene *recA*-Genfragment zusätzlich eine Deletion eines zentralen, 455 bp großen DNA-Abschnittes auf.

Die für die Integration der Kanamycin-Resistenzgen-Kassette erforderliche BamHI-Schnittstelle in der *recA*-Gensequenz wurde durch den gezielten Austausch jeweils eines Basenpaares durch eine Mutagenese mit mutierenden Oligonukleotiden erhalten. Während die Transition C/A in Position 250 des *M.clara recA*-Fragmentes keine Veränderung in der Aminosäuresequenz hervorruft, wird durch die Transversion A/G in Position 702 des Fragmentes das Glutamin-Codon CAG durch das Arginin-Codon CGG ersetzt. Diese Aminosäuresubstitution führt dazu, daß das mutierte *M.clara recA*-Gen zumindest eine Teilfunktion (UV-Resistenz) des *E.coli recA*-Genes nicht mehr komplementieren kann (nicht gezeigte Daten).

Die *in vitro*-modifizierten *recA*-Genkonstrukte wurden unter Verwendung eines Konjugationssystems in den *Methylobacterium clarae*-Stamm B45-BE1 eingeführt.

Effiziente Systeme zur Transformation von *M.clara*-Zellen konnten bislang nicht entwickelt werden (Kües 1988); da auch keine *M.clara*-spezifischen, transduzierenden Phagen bekannt sind, basieren die bisher entwickelten DNA-Übertragungssysteme auf der konjugativen Mobilisierung geeigneter Vektoren nach *M.clara* (Marquardt 1983).

Die Verwendung eines Suizidvektors, der keinen in *M.clara* funktionierenden Replikationsursprung besitzt, ermöglichte eine indirekte Selektion auf *M.clara recA*-Mutanten: Das in den inaktivierten *recA*-Genen der eingeführten Hybridvektoren enthaltene Kanamycin-Resistenzgen kann nur in der *M.clara*-Zelle erhalten bleiben, wenn es in die chromosomale Wirts-DNA integriert wird ("marker rescue").

Durch die Verwendung von Suizidvektoren kann die Selektion der gewünschten Mutanten wesentlich erleichtert werden (Ruvkun und Ausubel 1981). Eine weitere Möglichkeit stellt z.B. die Verdrängung des übertragenen Vektors durch die zusätzliche Einführung eines inkompatiblen Plasmides dar (Garfinkel et al. 1981, Ruvkun et al. 1982).

Die konjugativ in *M.clara* eingeführten Hybridvektoren pMCR312K, pMCR313K und pMCR314K rekombinieren mit dem homologen *recA*-Gen-locus in der chromosomalen *M.clara* DNA.

In Abhängigkeit von den in diesen Experimenten eingesetzten Hybridvektoren wurden Kanamycin-resistente *M.clara*-Transkonjuganten erhalten, die durch die in Abb. 19 dargestellten Rekombinationsvorgänge entstanden sein könnten. Wie aus der Darstellung ersichtlich ist, wurde ein Austausch des nativen *recA*-Genes ausschließlich bei Verwendung der Vektoren pMCR312K und pMCR313K, deren *recA*-Gensequenz durch die Integration der Kanamycin-Resistenzgen-Kassette unterbrochen worden ist, erzielt. Bei Verwendung des Vektors pMCR314K, bei dem vor der Integration der Kanamycin-Resistenzgen-Kassette ein Teil der *recA*-Gensequenz deletiert worden ist, war ein ähnlicher Genaustausch erwartet worden. Trotz eingehender Untersuchung von mehr als 1.200 Kanamycin-resistenten *M.clara*-Transkonjuganten konnte jedoch kein derartiger Genaustausch beobachtet werden. Stattdessen scheint durch den in Abb. 19 dargestellten Mechanismus an Stelle eines solchen Austausches die Integration des gesamten eingesetzten Vektors stattgefunden zu haben. Dieses Ergebnis wird auch durch die bei einigen dieser Kanamycin-resistenten Transkonjuganten durchgeführten physiologischen Tests und Hybridisierungsanalysen der chromosomalen DNA belegt (nicht gezeigte Daten).

Ein ähnliches Phänomen ist auch bei der Herstellung einer *Vibrio cholerae recA*-Mutante (Goldberg und Mekalanos 1986) beobachtet worden: Unter Verwendung eines dem Vektor pMCR314K ähnlichen Konstruktes, bei dem ein Teil des *Vibrio cholerae recA*-Genes deletiert und durch eine Antibiotika-Resistenzmarke ersetzt worden

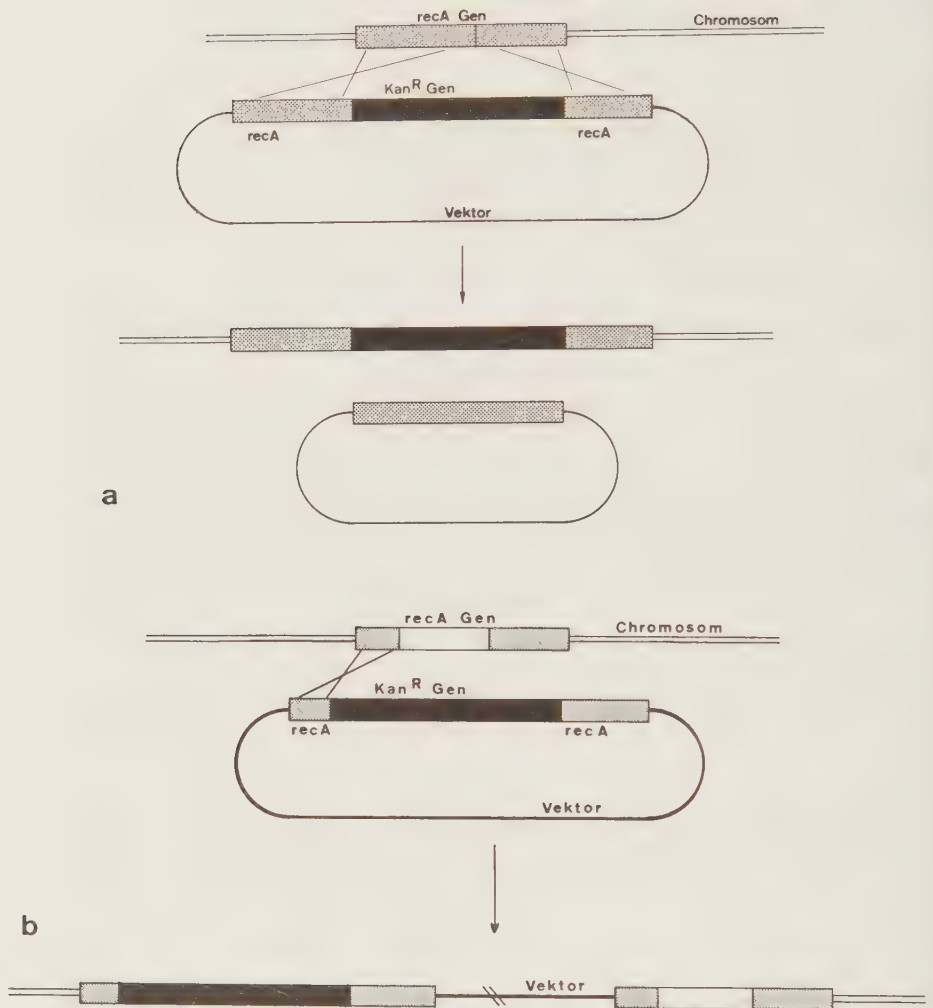


Abb. 19

Schematische Darstellungen der möglichen Rekombinationsereignisse nach der Einführung der Vektoren pMCR312K, pMCR313K und pMCR314K (vgl. IV. Ergebnisse, Abb. 11) nach *M. clara*. Grau unterlegter Bereich: *recA*-Gensequenzen; schwarzer Bereich: Kanamycin-Resistenzgen-Kassette.

- Die Verwendung der pMCR312K- und pMCR313K-Konstrukte führt vermutlich durch einen Doppel-Crossover zu einem Austausch des nativen *recA*-Genes gegen die in vitro-inaktivierte Genkopie.
- Das Konstrukt pMCR314K, bei dem ein Teil der *recA*-Gensequenz deletiert worden ist (weißer Bereich im nativen *recA*-Gen), führt nur zur Integration des gesamten Vektors in die chromosomale DNA. Das native *recA*-Gen wird auf diese Weise nicht deletiert.

ist, konnte ebenfalls kein Austausch des nativen *recA*-Genes durch die inaktivierte Genkopie erzielt werden. Goldberg und Mekalanos (1986) erklären dies dadurch, daß möglicherweise die zu dem nativen *recA*-Gen homologen DNA-Sequenzen, die das Antibiotika-Resistenzgen flankieren, zu klein sind, um zu einem Genaustausch durch ein Doppel-Crossover-Ereignis zu führen.

Die Verwendung von Vektoren, bei denen das auszutauschende Gen ausschließlich durch die Insertion einer Resistenzmarke unterbrochen worden ist, scheint somit der geeignetere Weg zur Inaktivierung chromosomaler Gene durch Genaustauschvorgänge bei *M.clara* zu sein.

Der Einfluß dieser *recA*-Mutation auf die Rekombination in *M.clara* ist noch nicht ausgiebig überprüft worden. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß bei den bisher daraufhin untersuchten *recA*-Mutanten unterschiedlichster Bakteriengattungen das Auftreten homologer Rekombinationsereignisse vollständig unterdrückt wurde (vgl. I. Einführung, Tab. 3), kann jedoch auch bei dieser *M.clara* *recA*-Mutante eine solche Auswirkung der *recA*-Mutation erwartet werden.

VI. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Konstruktion einer *Methylomonas clara* *recA*-Defektmutante vorgestellt. Die Untersuchungen erbrachten zusammengefaßt folgende Ergebnisse:

1. Das *recA*-Gen von *Methylomonas clara* wurde durch DNA-DNA-Hybridisierung mit der heterologen *E.coli* *recA*-Gensonde identifiziert.
2. Aus der in einem *Lambda*-Vektor angelegten Genbank der genomischen *M.clara*-DNA wurde das *recA*-Gen DNA-Fragment isoliert und in *E.coli* kloniert.
3. Die molekulare Charakterisierung dieses Fragmentes durch Bestimmung der DNA-Sequenz zeigt, daß das *M.clara* *recA*-Gen aus einem 1029 bp langen Leserahmen besteht, der für 342 Aminosäuren kodiert.
4. Der Vergleich der ermittelten Nukleotid- und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz mit den bisher sequenzierten *recA*-Genen von *E.coli* und *P.aeruginosa* weist auf eine starke Konservierung dieser Gene hin. Einige mit essentiellen Funktionen verbundene Domänen des *E.coli* RecA-Proteins sind sowohl bei dem *M.clara* als auch bei dem *P.aeruginosa* RecA-Protein völlig identisch.
5. Die Überexpression in *E.coli* bestätigt, daß von dem klonierten *M.clara* *recA*-Gen tatsächlich ein den 342 Aminosäuren entsprechendes, 37 kD großes Protein gebildet wird.
6. Das *M.clara* *recA*-Genprodukt ist in *E.coli* physiologisch aktiv: Die auf einer *recA*-Mutation beruhende UV-Sensibilität des *E.coli*-Stammes HB101 wird durch das eingeführte *M.clara* *recA*-Gen komplementiert.

7. Zur Inaktivierung des *M.clara* *recA*-Genes wurde in den kodierenden Genbereich nach gezielten *in vitro*-Mutagenesen ein Antibiotika-Resistenzgen integriert.
8. Nach konjugativer Einführung des inaktivierten *recA*-Genes in *M.clara* wurde das native *M.clara*-Gen durch homologe Rekombinationsvorgänge gegen die *in vitro*-inaktivierte *recA*-Genkopie ausgetauscht.
9. Die *recA*-negativen *M.clara*-Mutanten wurden durch molekulare Analysen und die Überprüfung ihres UV-Resistenzverhaltens bestätigt.

Damit stehen die für die Entwicklung eines stabilen *Methylomonas clara* Wirts-/Vektorsystemes erforderlichen rekombinationsdefizienten Mutanten zur Verfügung.

VII. Literatur

- Allen LN, Hanson RS (1985) Construction of broad-host-range cosmid cloning vectors: identification of genes necessary for growth of *Methylobacterium organophilum* on methanol. J Bacteriol 161: 955-962
- Anthony C (1982) Biochemistry of methylotrophs. Academic Press, London
- Austin S, Friedman S, Ludtke D (1986) Partition functions of unit-copy plasmids can stabilize the maintenance of plasmid pBR322 at low copy number. J Bacteriol 168: 1010-1014
- Bachmann BJ, Low KB (1980) Linkage map of *Escherichia coli* K12, edition 6. Microbiol Rev 44: 1-56
- Baker TA, Grossman AD, Gross CA (1984) A gene regulating the heat shock response in *E.coli* also affects proteolysis. Proc Natl Acad Sci USA 81: 6779-6783
- Beck Y, Bartfeld D, Yavin Z, Levanon A, Gorecki M, Hartmann JR (1988) Efficient production of active human manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli*. Bio/Technology 6: 930-935
- Benton WD, Davis RW (1977) Screening *lambda*-gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. Science 196: 180-182
- Better M, Helinski DR (1983) Isolation and characterization of the *recA* gene of *Rhizobium meliloti*. J Bacteriol 155: 311-316
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl Acids Res 7: 1513-1522
- Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW (1977) Construction and characterization of new cloning vectors. II. A multipurpose cloning system. Gene 2: 95-113
- Boyer HW, Roulland-Dussoix D (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. J Mol Biol 41: 459-472
- Brousseau R, Scarpulla R, Sung W, Hsiung HM, Narang SA, Wu R (1982) Synthesis of a human insulin gene. V. Enzymatic assembly, cloning and characterization of the human proinsulin DNA. Gene 17: 279-289
- Brutlag D, Fry K, Nelson T, Hung P (1977) Synthesis of hybrid bacterial plasmids containing highly repetitive satellite DNA. Cell 10: 509-519

- Buell G, Shulz MF, Selzer G, Chollet A, Movva NR, Semon D, Escanez S, Kawashima E (1985) Optimizing the expression in *E.coli* of a synthetic gene encoding somatomedin-C (IGF-I). *Nucl Acids Res* 13: 1923-1938
- Caulcott CA, Lilley G, Wright EM, Robinson MK, Yarranton GT (1985) Investigation of the instability of plasmids during the expression of met-prochymosin in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 131: 3355-3365
- Caulcott CA, Rhodes M (1986) Temperature-induced synthesis of recombinant proteins. *TIBTECH* 4: 142-146
- Charney P, Gervais M, Louise A, Galibert F, Tiollais P (1980) Biosynthesis of hepatitis B virus surface antigen in *Escherichia coli*. *Nature* 286: 893-895
- Chung CH, Goldberg AL (1981) The product of the *lon* (*capR*) gene in *Escherichia coli* is the ATP-dependent protease, protease La. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 4931-4935
- Clark AJ, Marquilies AD (1965) Isolation and characterization of recombination deficient mutants of *E.coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci USA* 53: 451-459
- Clark AJ (1973) Recombination deficient mutants of *Escherichia coli* and other bacteria. *Ann Rev Genet* 7: 67-86
- Clarke L, Carbon J (1976) A colony bank containing synthetic Col E1 hybrid plasmids representative of the entire *E.coli* genome. *Cell* 9: 91-99
- Claverys JP, Lacks SA (1986) Heteroduplex deoxyribonucleic acid base mismatch repair in bacteria. *Microbiol Rev* 50: 133-165
- Cox MM, Lehman IR (1987) Enzymes of general recombination. *Ann Rev Biochem* 56: 229-262
- Crueger A (1988) Mikrobielle Protoplasten - ihre Anwendung in Biochemie und Genetik. In: Präve P, Schlingman M, Crueger W, Esser K, Thauer R, Wagner F (eds) *Jahrbuch der Biotechnologie Bd.2*, Carl Hanser Verlag, München, Wien, pp 383-410
- Crueger W, Crueger A (1989) *Biotechnologie: Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie*. Oldenbourg Verlag München Wien
- Dale RMK, McClure BA, Houchins JP (1985) A rapid single-stranded cloning strategy for producing a sequential series of overlapping clones for use in DNA sequencing: application to sequencing the corn mitochondrial *18S rDNA*. *Plasmid* 13: 31-40
- de Maeyer E, Skup D, Prasad KSN, de Maeyer-Guignard J, Williams B, Meacock P, Sharpe G, Pioloi D, Hennam J, Schuch W, Atherton K (1982) Expression of a chemically synthesized human α interferon gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 4256-4259

- Devos R, Plaetinck G, Cherourtire H, Simons G, Degrave W, Tavernier J, Remaut E, Fiers W (1983) Molecular cloning of human interleukin 2 cDNA and its expression in *E.coli*. *Nucl Acids Res* 11: 4307-4323
- Dijkhuizen L, Hansen TA, Harder W (1985) Methanol - a potential feedstock for biotechnological processes. *Trends in Biotechnol* 3: 262-267
- Doi RH, Wang L (1986) Multiple prokaryotic ribonucleic acid polymerase sigma factors. *Microbiol Rev* 50: 227-243
- Dreiseikelmann B, Eichenlaub R, Wackernagel W (1979) The effect of differential methylation by *Escherichia coli* of plasmid DNA and phage T7 and lambda-DNA on the cleavage by restriction endonuclease MboI from *Moraxella bovis*. *Biochem Biophys Acta* 562: 418-428
- Edman JC, Hallewell RA, Valenzuela P, Goodman HM, Rutter WJ (1981) Synthesis of hepatitis B surface and core antigens in *E.coli*. *Nature* 291: 503-506
- Eisenberg D (1984) Three-dimensional structure of membrane and surface proteins. *Ann Rev Biochem* 53: 595-623
- Eitner G, Solonin AS, Tanyashin VI (1981) Cloning of a recA-like gene of *Proteus mirabilis*. *Gene* 14: 301-308
- Eitner G, Adler B, Lanzov VA, Hofemeister J (1982) Interspecies RecA-protein substitution in *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Mol Gen Genet* 185: 481-486
- Emtage JS, Tacon CA, Catlin GH, Jenkins B, Porter AG, Carey NH (1980) Influenza antigenic determinants are expressed from haemagglutinin genes cloned in *Escherichia coli*. *Nature* 283: 171-174
- Emtage JS, Angal S, Doel MT, Harris TJR, Jenkins B, Lilley G, Lowe P (1983) Synthesis of calf prochymosin (prorennin) in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 3671-3675
- Esser K, Meinhardt F (1984) Mikroorganismen. In: Präve P, Faust U, Sittig W, Sukatsch DA (eds) *Handbuch der Biotechnologie*. Oldenbourg Verlag, München, pp 13-51
- Esser K, Kück U, Lang-Hinrichs C, Lemke P, Osiewacz HD, Stahl P, Tudzynski P (1986) Plasmids of eukaryotes: Fundamentals and applications. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo
- Faust U, Präve P, Sukatsch DA (1977) Continuous biomass production from methanol by *Methylomonas clara*. *J Ferment Technol* 55: 609-614
- Fedoroff N (1983) Comparison of host strains for cloning maize DNA in bacteriophage lambda. *Plant Mol Biol Rep* 1: 27-29

- Feinstein SI, Chernajovsky Y, Chen L, Maroteaux L, Mory Y (1983) Expression of the human interferon genes using the *recA*-promoter of *Escherichia coli*. Nucl Acids Res 11: 2927-2941
- Finch PW, Brough CL, Emmerson PT (1986) Molecular cloning of a *recA*-like gene of *Methylophilus methylotrophus* and identification of its product. Gene 44: 47-53
- Fredrickson A (1977) Behaviour of mixed cultures of micro-organisms. Ann Rev Microbiol 31: 63-87
- Frischauf AM, Lehrach H, Poustka A, Murray N (1983) Lambda-replacement vectors carrying polylinker sequences. J Mol Biol 170: 827-842
- Früh R, Watson JM, Haas D (1983) Construction of recombination-deficient strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Gen Genet 191: 334-337
- Garfinkel DJ, Simpson RB, Ream LW, White FF, Gordon MP, Nester EW (1981) Genetic analysis of crown gall: fine structure map of the T-DNA by site-directed mutagenesis. Cell 27: 143-153
- Geier GE, Modrich P (1979) Recognition sequence of the *dam* methylase of *E. coli* K-12 and mode of cleavage of DpnI endonuclease. J Biol Chem 254: 1408-1413
- Geoghegan CM, Houghton JA (1987) Molecular cloning and isolation of a cyanobacterial gene which increases the UV and methyl methanesulfonate survival of *recA* strains of *Escherichia coli* K12. J Gen Microbiol 133: 119-126
- Georgiou G, Telford J, Shuler M, Wilson B (1986) Localization of inclusion bodies in *Escherichia coli* overproducing β -lactamase or alkaline phosphatase. Appl Env Microbiol 52: 1157-1161
- Gerdes K (1988) The *parB* (*hok/sok*) locus of plasmid R1: a general purpose plasmid stabilization system. Bio/Technology 6: 1402-1405
- Gerdes K, Larsen JEL, Molin S (1985) Stable inheritance of plasmid R1 requires two different loci. J Bacteriol 161: 292-298
- Gilbert W (1978) Why genes in pieces. Nature 271: 501
- Gill DR, Hatfull GF, Salmond GPC (1986) A new cell division operon in *Escherichia coli*. Mol Gen Genet 205: 134-145
- Glover DM (1985) DNA cloning Vol. I: A practical approach. IRL Press Limited, Oxford
- Glover DM (1987) DNA cloning Vol. III: A practical approach. IRL Press Limited, Oxford

- Goeddel DV, Heyneker HL, Hozumi T, Arentzen R, Itakura K, Yansura DG, Ross MJ, Miozzari G, Crea R, Seeburg PH (1979a) Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormon. *Nature* 281: 544-548
- Goeddel DV, Kleid DG, Bolivar F, Heyneker HL, Yansura DG, Crea R, Hirose T, Kraszewski A, Itakura K, Riggs AD (1979b) Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 106-110
- Goeddel DV, Yelverton E, Ullrich A, Heyneker AL, Miozzari G, Holmes W, Seeburg PH, Dull T, May L, Stebbing N, Crea R, Maeda S, McCandliss R, Sloma A, Tabor JM, Gross M, Familletti PC, Pestka S (1980) Human leukocyte interferon produced by *E.coli* is biologically active. *Nature* 287: 411-416
- Goff SA, Casson LP, Goldberg AL (1984) Heat shock regulatory gene *hspR* influences rates of protein degradation and expression of the *lon* gene in *E.coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 6647-6651
- Goff SA, Goldberg AL (1985) Production of abnormal proteins in *E.coli* stimulates the transcription of *lon* and other heat shock genes. *Cell* 41: 587-595
- Gold L, Pribnow D, Schneider T, Shinedling S, Singer BS, Stormo G (1981) Translational initiation in procaryotes. *Ann Rev Microbiol* 35: 365-403
- Goldberg I, Mekalanos JJ (1986) Cloning of the *Vibrio cholerae* *recA* gene and construction of a *Vibrio cholerae* *recA* mutant. *J Bacteriol* 165: 715-722
- Goodman HJK, Parker JR, Southern JA, Woods DR (1987) Cloning and expression in *Escherichia coli* of a *recA*-like gene from *Bacteroides fragilis*. *Gene* 58: 265-271
- Gottesman S, Gottesman M, Shaw JE, Pearson ML (1981) Protein degradation in *E.coli*. The *lon* mutation and bacteriophage *lambda* N and cII protein stability. *Cell* 24: 225-234
- Greenberg R, Gewain KM, Shaw KJ, Frommer B, Anagnost JA, Zurawski G, Narula SK, Leibowitz PJ (1988) Requirements for the high-level expression of murine interleukin-3 cDNA in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol* 3: 333-341
- Grosjean H, Fiers W (1982) Preferential codon usage in prokaryotic genes: the optimal codon-anticodon interaction energy and the selective codon usage in efficiently expressed genes. *Gene* 18: 199-209
- Gross M, Sweet RW, Sathe G, Yokoyama S, Fasano O, Goldfarb M, Wigler M, Rosenberg M (1985) Purification and characterization of human H-ras proteins expressed in *Escherichia coli*. *Mol Cell Biol* 5: 1015-1024

- Grunstein M, Hogness D (1975) Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 3961-3965
- Guttersen NI, Koshland DE jr (1983) Replacement and amplification of bacterial gene with sequences altered *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 4894-4898
- Haber CL, Allen LN, Zhao S, Hanson RS (1983) Methylophilic bacteria: biochemical diversity and genetics. *Science* 221: 1147-1153
- Hahn J, Dubnau D (1985) Analysis of plasmid deletional instability in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 162: 1014-1023
- Hallewell RA, Masiarz FR, Najarian RC, Puma JP, Quiroga MR, Randolph A, Sanchez-Pescador R, Scandella CT, Smith B, Steiner KS, Mullenbach GT (1985) Human CuZn superoxide dismutase cDNA: isolation of clones synthesizing high levels of active or inactive enzyme from an expression library. *Nucl Acids Res* 13: 2017-2034
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580
- Hanahan D (1987) Mechanisms of DNA transformation. In: Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, Schaechter M, Umberger HE (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. ASM, Washington D.C., pp 1177-1183
- Hamood AN, Pettis GS, Parker CD, McIntosh MA (1986) Isolation and characterization of the *Vibrio cholerae* *recA* gene. *J Bacteriol* 167: 375-378.
- Hartman JR, Geller T, Yavin Z, Bartfeld D, Kanner D, Aviv H, Gorecki M (1986) High-level expression of enzymatically active human CuZn superoxide dismutase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 7142-7146
- Hautala JA, Bassett CL, Giles NH, Kushner SR (1979) Increased expression of a eukaryotic gene in *Escherichia coli* through stabilization of its messenger RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 5774-5778
- Hawley DK, McClure WR (1983) Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucl Acids Res* 11: 2237-2255
- Heiland I, Gething MJ (1981) Cloned copy of the haemagglutinin gene codes for human influenza antigenic determinants in *E.coli*. *Nature* 292: 851-852
- Hellebrust H, Murby M, Abrahmsen L, Uhlen M, Enfors SO (1989) Different approaches to stabilize a recombinant fusion protein. *Bio/Technology* 7: 165-168

- Hennam JF, Cunningham AE, Sharpe GS, Atherton KT (1982) Expression of eucaryotic coding sequences in *Methylophilus methylotrophus*. *Nature* 297: 80-82
- Hickman MJ, Orser CS, Willis DK, Lindow SE, Panopoulos NJ (1987) Molecular cloning and biological characterization of the *recA* gene from *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol* 169: 2906-2910
- Higgins CF, Hiles ID, Whalley K, Jamieson DJ (1985) Nucleotide binding by membrane components of bacterial periplasmic binding protein-dependent transport system. *EMBO J* 4: 1033-1040
- Hoess A, Arthur AK, Wanner G, Fanning E (1988) Recovery of soluble, biologically active recombinant proteins from total bacterial lysates using ion exchange resin. *Bio/Technology* 6: 1214-1217
- Hohn B (1979) *In vitro* packaging of *lambda* and cosmid DNA. *Meth Enzymol* 68: 299-309
- Hohnloser W, Lingens F, Präve P (1978) Characterization of a new methylotrophic strain, *Methylomonas clara*. *J Appl Microbiol Biotechnol* 6: 167-179
- Holloway BW (1984a) Genetic techniques for methylotrophs. In: Crawford RL, Hanson RS (eds) *Microbial growth on C1-compounds*. ASM, Washington DC, pp 215-220
- Holloway BW (1984b) Genetics of methylotrophs. In: Hou CT (ed) *Methylotrophs: microbiology, biochemistry and genetics*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 87-106
- Holloway BW, Kearny PP, Lyon BR (1987) The molecular genetics of C1 utilizing microorganisms. An overview. *Antonie van Leeuwenhoek* 53: 47-53
- Holmes WM, Platt T, Rosenberg M (1983) Termination of transcription in *E.coli*. *Cell* 32: 1029-1032
- Hood DW, Dow CS, Green PN (1987) DNA:DNA hybridization studies on the pink-pigmented facultative methylotrophs. *J Gen Microbiol* 133: 709-720
- Horii T, Ogawa T, Ogawa H (1980) Organization of the *recA* gene of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 313-317
- Imanaka T (1986) Application of recombinant DNA technology to the production of useful biomaterials. In: Fiechter A (ed) *Advances in Biochemical Engineering, Biotechnology*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, pp 1-27
- Imanaka T, Tsunekawa H, Aiba S (1980) Phenotypic stability of *trp* operon recombinant plasmids in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 118: 253-261

- Imanaka T, Ano T, Fujii M, Aiba S (1984) Two replication determinants of an antibiotic-resistance plasmid, pTB19, from a thermophilic *Bacillus*. *J Gen Microbiol* 130: 1399-1408
- Itakura K, Hirose T, Crea R, Riggs AD, Heyneker AL, Bolivar F, Boyer HW (1977) Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science* 198: 1056-1063
- Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mafson A, Seehra J, Jones SS, Henrich R, Fritch EF, Kawakita M, Shimizu T, Miyake T (1985) Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 313: 806-810
- Jenkins O, Jones D (1987) Taxonomic studies on some gramnegative methylotrophic bacteria. *J Gen Microbiol* 133: 453-473
- Karn J, Brenner S, Barnett L, Cesareni G (1983) Novel bacteriophage cloning vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 5172
- Karsch T (1988) Evolution mitochondrialer Gene - Strukturanalyse von Gruppe I Intronen im Chondriom des Ascomyceten *Podospora anserina*. In: Cramer J (ed): *Bibliotheca Mycologica* 124, Borntraeger Verlagsbuchhandlung, Berlin Stuttgart
- Kasunic DA, Kushner SR (1980) Expression of the *HIS3* gene of *Saccharomyces cerevisiae* in polynucleotide phosphorylase deficient strains of *Escherichia coli* K-12. *Gene* 12: 1-10
- Kawamura F, Doi RH (1984) Construction of a *Bacillus subtilis* double mutant deficient in extracellular alkaline and neutral proteases. *J Bacteriol* 160: 442-444
- Kawashima H, Horii T, Owaga T, Ogawa H (1984) Functional domains of *Escherichia coli* recA protein deduced from the mutational sites in the gene. *Mol Gen Genet* 193: 288-292
- Keener SL, McNamee KP, McEntee KP (1984) Cloning and characterization of *recA* genes from *Proteus vulgaris*, *Erwinia carotovora*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli* B/r. *J Bacteriol* 160: 153-160
- Kessler C, Hölte HJ (1986) Specificity of restriction endonucleases - a review. *Gene* 47: 1-153
- King PV, Blakesley RW (1986) Optimizing DNA ligations for transformation. *Focus* 8: 1-3
- Kitano K, Fujimoto S, Nakao M, Witanable T, Nakao Y (1987) Intracellular degradation of recombinant proteins in relation to their location in *Escherichia coli* cells. *J Biotechnol* 5: 77-86

- Knight KL, Hess RM, McEntee K (1988) Conservation of an ATP-binding domain among RecA proteins from *Proteus vulgaris*, *Erwinia carotovora*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli* K-12 and B/r. *J Bacteriol* 170: 2427-2432
- Kogoma T, Skarstas K, Boye E, von Meyenburg K, Steen HB (1985) RecA protein acts at the initiation of stable DNA replication in *rnh* mutants of *Escherichia coli* K12. *J Bacteriol* 163: 439-444
- Kokjohn TA, Miller RV (1985) Molecular cloning and characterization of the *recA* gene of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J Bacteriol* 163: 568-572
- Kolter R, Yanofsky C (1982) Attenuation in amino acid biosynthetic operons. *Ann Rev Genet* 16: 113-134
- Koomey JM, Falkow S (1987) Cloning of the *recA* gene of *Neisseria gonorrhoeae* and construction of gonococcal *recA* mutants. *J Bacteriol* 169: 790-795
- Kowalczykowski SC (1987) Mechanistic aspects of the DNA strand exchange activity of *E.coli* *recA* protein. *TIBS* 12: 141-145
- Kreil G (1981) Transfer of proteins across membranes. *Ann Rev Biochem* 50: 317-348
- Krieg NR, Holt JG (1985) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol I. Williams & Wilkins, Baltimore, London
- Kück U (1981) Struktur und Funktion mitochondrialer DNA bei Pilzen. In: Cramer J (ed): *Bibliotheca Mycologica* 84. AR Ganter Verlag, Vaduz
- Kües U (1988) Replikation von Plasmiden in gram-negativen Bakterien; extrachromosomale Genetik bei *Methylobacterium clausii*. Dissertation, Technische Universität Berlin
- Küpper H, Keller W, Kurz C, Forss S, Schaller H, Franze R, Strohmaier K, Marquardt O, Zaslarsky VG, Hofschneider PH (1981) Cloning of cDNA of major antigen of foot and mouth disease virus and expression in *Escherichia coli*. *Nature* 289: 555-559
- Kuramitsu S, Hamaguchi K, Tachibana H, Horii T, Ogawa T, Ogawa H (1984) Cysteine residues of *Escherichia coli* *recA* protein. *Biochemistry* 23: 2363-2367
- Kushner SR (1987) Useful host strains and techniques for recombinant DNA experiments. In: Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, Schaechter M, Umberger HE (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. ASM, Washington D.C., pp 1225-1230
- Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157: 105-132

- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lang BF, Burger G (1986) A collection of programs for nucleic acid and protein analysis, written in Fortran 77 for IBM-PC compatible microcomputers. *Nucl Acids Res* 14: 455-465
- Langley KE, Villarejo MR, Fawcett AV, Zamenhof PJ, Zabin I (1975) Molecular basis of β -Galactosidase α -complementation. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 1254-1257
- Larsen JEL, Gerdes K, Light J, Molin S (1984) Low-copy-number plasmid cloning vectors amplifiable by derepression of an inserted foreign promoter. *Gene* 28: 45-54
- Lauffenburger DA (1987) Bacteriocin production as a method of maintaining plasmid-bearing cells in continuous culture. *TIBTECH* 5: 87-89
- Leach DR, Stahl F (1983) Viability of *lambda* phages carrying a perfect palindrome in the absence of recombination nucleases. *Nature* 305: 448-451
- Levering PR, Tiesma L, Woldendorp JP, Steensma M, Dijkhuizen L (1987) Isolation and characterization of mutants of the facultative methylotroph *Arthrobacter* P1 blocked in one-carbon metabolism. *Arch Microbiol* 146: 346-352
- Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JL, Chen KK, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z, Badrawi SM, Lai PH, Goldwasser E (1985) Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 7580-7584
- Lingens F (1988) Mikrobieller Abbau von aromatischen Verbindungen. In: Pr ve P, Schlingmann M, Crueger W, Esser K, Thauer R, Wagner F (eds) *Jahrbuch der Biotechnologie 1988/89*, Bd.2. Hauser, München Wien, pp 297-318
- Lipman P, Pearson WR (1985) Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science* 277: 1435-1441
- Little JW, Mount DW (1982) The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell* 29: 11-22
- Little JW (1984) Autodigestion of *lexA* and phage *lambda* repressors. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1375-1379
- Lopez P, Espinosa M, Greenberg B, Lacks SA (1984) Generation of deletions in pneumococcal *mal* genes cloned in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 5189-5193
- Lovett CM jr, Roberts JW (1985) Purification of a RecA protein analogue from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 260: 3305-3313

- Lovett CM jr, Love PE, Yasbin RE, Roberts JW (1988) SOS-like induction in *Bacillus subtilis*: induction of the RecA protein analog and a damage-inducible operon by DNA damage in *rec+* and DNA repair-deficient strains. *J Bacteriol* 170: 1467-1474
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Margolin P (1987) Generalized transduction. In: Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, Schaechter M, Umberger HE (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. ASM, Washington D.C., pp 1154-1168
- Marquardt R (1983) Untersuchungen an Plasmiden aus den obligat methylophen Bakterienstämmen *Methylomonas clara* B45-BE2 und B45-BE3. Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität München
- Marquardt R, Wöhner G, Winnacker EL (1984) Properties of plasmids from *Methylomonas clara*. *J Biotechnol* 1: 317-330
- Marston FAO (1987) The purification of eukaryotic polypeptides expressed in *Escherichia coli*. In: Glover DM (ed) DNA cloning. Vol. III, IRL Press, Oxford, Washington DC, pp 59-88
- Martial JA, Hallewell RA, Baxter JD, Goodman HM (1979) Human growth hormone: Complementary DNA. Cloning and expression in bacteria. *Science* 205: 602-607
- Maurizi MR, Trisler P, Gottesman S (1985) Insertional mutagenesis of the *lon* gene in *Escherichia coli*: *lon* is dispensable. *J Bacteriol* 164: 1124-1135
- Maxam AM, Gilbert W (1980) Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavage. *Meth Enzymol* 65: 499-560
- McClure WR (1985) Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes. *Ann Rev Biochem* 54: 171-204
- McDonnell MW, Simon MN, Studier FW (1977) Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol* 110: 119-146
- McEntee K, Weinstock GM, Lehman IR (1979) Initiation of general recombination catalyzed *in vitro* by the RecA protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 2615-2619
- Meinhardt F (1987) Gentransfer bei Bakterien und Pilzen. Habil. Schrift, Bochum
- Messing J (1982) Notes on plasmids pUC8 and pUC9. *Focus* 4: 12
- Messing J, Crea R, Seeburg PH (1981) A system for shotgun DNA sequencing. *Nucl Acids Res* 9: 309-321

- Messing J (1983) New M13 vectors for cloning. In: Colowick SP, Kaplan NO (eds) *Meth Enzymol* 101: 20-79
- Metzler T, Marquardt R, Präve P, Winnacker EL (1988) Characterization of a promoter from *Methylomonas clara*. *Mol Gen Genet* 211: 210-214
- Miles CA, Mountain A, Sastry GRK (1986) Cloning and characterization of the *recA* gene of *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Mol Gen Genet* 204: 161-165
- Miyata T, Miyazawa S, Yasunaga T (1979) Two types of amino acid substitutions in protein evolution. *J Mol Evol* 12: 219-236
- Mizukami T, Yagisawa M, Oka T, Furuya A (1986) Improvement of the stability of recombinant plasmids carrying the threonine operon in an L-Threonine hyperproducing strain of *Escherichia coli* W. *Agric Biol Chem* 50: 1019-1027
- Mohr G (1989) Grundlagen, Anwendungen und Möglichkeiten der Stammverbesserung biotechnologisch relevanter Hyphenpilze durch die Gentechnik: Integrative Transformation von *Aspergillus niger*. In: Cramer J (ed) *Dissertationes Botanicae* 131, Borntraeger Verlagsbuchhandlung, Berlin, Stuttgart
- Moore AT, Nayadu M, Holloway BW (1983) Genetic mapping in *Methylophilus methylotrophus* AS1. *J Gen Microbiol* 129: 785-799
- Mori H, Koudo A, Ohshima A, Ogura T, Hiraya S (1986) Structure and function of the F plasmid genes essential for partitioning. *J Mol Biol* 192: 1-15
- Mount DW, Conrad B (1986) Improved programs for DNA and protein sequence analysis on the IBM personal computer and other standard computer systems. *Nucl Acids Res* 14: 443-454
- Murphy RC, Bryant DA, Porter RD, Tandeau de Marsac N (1987) Molecular cloning and characterization of the *recA* gene from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain 7002. *J Bacteriol* 169: 2739-2747
- Nader WF, Edlind TD, Huettermann A, Sauer HW (1985) Cloning of *Physarum* sequences in an exonuclease-deficient bacterial host. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 2698-2702
- Nagata S, Taira H, Hall A, Johnsrud L, Streuli M, Escödi J, Boll W, Cantell K, Weissmann C (1980) Synthesis in *E. coli* of a polypeptide with human leukocyte interferon activity. *Nature* 284: 316-320
- Nakayama KL, Eckstein F (1986) Inhibition of restriction endonuclease NciI cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis. *Nucl Acids Res* 14: 9679-9697
- Norrandner J, Kempe T, Messing J (1983) Improved M13 vectors using oligonucleotide-directed mutagenesis. *Gene* 26: 101-106

- Nunn DN, Lidstrom ME (1986) Isolation and complementation analysis of 10 methanol oxidation mutant classes and identification of the methanol dehydrogenase gene of *Methylobacterium* sp. strain AM1. *J Bacteriol* 166: 581-590
- Ogawa H, Ogawa T (1986) General recombination: functions and structure of RecA protein. *Adv Biophys* 21: 135-148
- Ohman DE, West MA, Flynn JL, Goldberg JB (1985) Method for gene replacement in *Pseudomonas aeruginosa* used in construction of *recA* mutants: *recA*-independent instability of alginate production. *J Bacteriol* 162: 1068-1074
- Ohsumi K, Nomura M, Tanaka S, Kubota I, Nakazoto H, Shinagawa H, Nakata A, Noguchi T (1983) Expression of chemically synthesized β -neo-endorphin gene fused to *E.coli* alkaline phosphatase. *Nucl Acids Res* 11: 1283-1294
- Oka A, Sugisaki H, Takanami M (1981) Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn 903. *J Mol Biol* 147: 217-226
- Osiewacz HD (1984) Mitochondriale Mosaikgene. Strukturaufklärung eines mobilen Introns aus dem Ascomyceten *Podospora anserina*. *Bibliotheca Mycologica* Bd. 94, Cramer J (ed), Vaduz
- Owtrim GW, Coleman JR (1987) Molecular cloning of a *recA*-like gene from the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J Bacteriol* 169: 1824-1829
- Palva I, Lehtovaara P, Kääriäinen L, Sibakov M, Cantell K, Schein CH, Kashiwagi K, Weissmann C (1983) Secretion of interferon by *Bacillus subtilis*. *Gene* 22: 229-235
- Paul K, Ghosh SK, Das J (1986) Cloning and expression in *Escherichia coli* of a *recA*-like gene from *Vibrio cholerae*. *Mol Gen Genet* 203: 58-63
- Pennica D, Homes WE, Kohr WJ, Harkins RN, Vehar GA, Ward CA, Bennett WF, Yelverton E, Seeburg PH, Heyneker HL, Goeddel DV, Collen D (1983) Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E.coli*. *Nature* 301: 214-221
- Perbal B (1988) A practical guide to molecular cloning. Wiley, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore
- Präve P, Faust U, Sittig W, Sukatsch DA (1984) *Handbuch der Biotechnologie*. Oldenbourg Verlag, München, Wien
- Pridmore RD (1987) New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. *Gene* 56: 309-312
- Radding CM (1981) Recombination activities of *E.coli* RecA protein. *Cell* 25: 3-4
- Radding CM (1982) Homologous pairing and strand exchange in genetic recombination. *Ann Rev Genet* 16: 405-437

- Ramesar RS, Woods DR, Rawlings DE (1988) Cloning and expression in *Escherichia coli* of a *recA*-like gene from the acidophilic autotroph *Thiobacillus ferrooxidans*. *J Gen Microbiol* 134: 1141-1146
- Reeck GR, Haen de C, Teller DC, Doolittle RF, Fitch WM, Dickerson RE, Chambon P, McLachlan AD, Margoliash E, Jukes TH, Zuckerkandl E (1987) "Homology" in proteins and nucleic acid: a terminology muddle and a way out of it. *Cell* 50: 667
- Rehm H-J (1980) Industrielle Mikrobiologie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Reid SJ, Sugrue JA, Thomson A (1986) Industrial applications of a cloned neutral protease gene in *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 24: 311-318
- Resnick D, Nelson DR (1988) Cloning and characterization of the *Aeromonas caviae* *recA* gene and construction of an *A.caviae* *recA* mutant. *J Bacteriol* 170: 48-55
- Reznikoff WS, Siegele DA, Cowing DW, Gross CA (1985) The regulation of transcription initiation in bacteria. *Ann Rev Genet* 19: 355-387
- Rigby PWJ, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P (1977) Labeling deoxy-ribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 113: 237-251
- Ruvkun GB, Ausubel FM (1981) A general method for site-directed mutagenesis in prokaryotes. *Nature* 289: 85-88
- Ruvkun GB, Sundareshan V, Ausubel FM (1982) Directed transposon Tn5 mutagenesis and complementation analysis of *Rhizobium meliloti* symbiotic nitrogen fixation genes. *Cell* 29: 551-559
- Sain B, Murray NE (1980) The *hsd* (host specificity) genes of *E.coli* K12. *Mol Gen Genet* 180:35-46
- Sancar A, Stachelek C, Konigsberg W, Rupp WD (1980) Sequences of the *recA* gene and protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 2611-2615
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467
- Sano Y, Kageyama M (1987) The sequence and function of the *recA* gene and its protein in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Mol Gen Genet* 208: 412-419.
- Saurugger PN, Hrabak O, Schwab H, Lafferty RM (1988) Mapping and cloning of the *par*-region of broad-host-range plasmid RP4. *J Biotechnol* 4: 333-343
- Schein CH, Noteborn MHM (1988) Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Bio/Technology* 6: 291-300

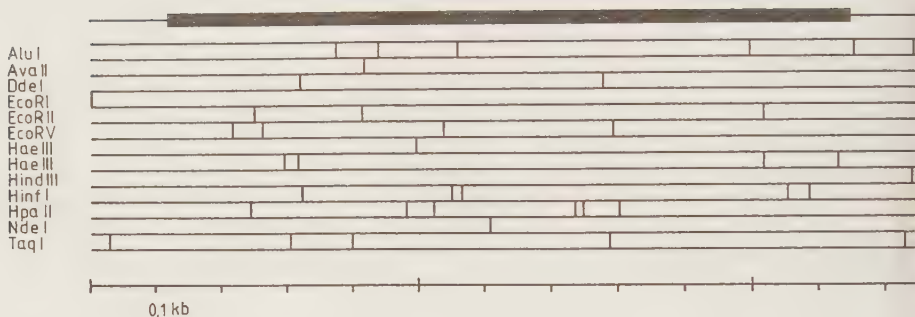
- Schoemaker JM, Brasnett AH, Marston FAO (1985) Examination of calf prochymosin accumulation in *Escherichia coli*: disulphide linkages are a structural component of prochymosin-containing inclusion bodies. *EMBO J* 4: 775-780
- Shibata T, DasGupta C, Cunningham RP, Radding CM (1979) Purified *Escherichia coli* RecA protein catalyzes homologous pairing of superhelical DNA and single-stranded fragments. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 1638-1642
- Shine J, Fettes I, Lan NCY, Roberts JL, Baxter JD (1980) Expression of cloned β -endorphin gene sequences by *Escherichia coli*. *Nature* 285: 456-461
- Simon R, Priefer U, Pühler A (1983) Vector plasmids for *in vivo* and *in vitro* manipulations of gram-negative bacteria. In: Pühler A (ed) *Molecular genetics of the bacteria-plant interaction*. Springer Verlag, Berlin, pp 98-106
- Simons G, Remant E, Allet B, Devos R, Fiers W (1984) High-level expression of human interferon gamma in *Escherichia coli* under control of the PL promoter of bacteriophage lambda. *Gene* 28: 55-64
- Simons RW, Kleckner N (1988) Biological regulation by antisense RNA in prokaryotes. *Ann Rev Genet* 22: 567-600
- Sinha ND, Biernat J, McManus J, Köster H (1984) Polymer support oligonucleotide synthesis XVIII: use of β -cyanoethyl-N,N-diakylamino-/N-morpholino phosphoramidite of deoxynucleosides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product. *Nucl Acids Res* 12: 4539-4557
- Skogman F, Nilsson J, Gustafsson P (1983) The use of a partition locus to increase stability of tryptophan-operon-bearing plasmids in *Escherichia coli*. *Gene* 23: 105-115
- Southern E (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517
- Stahl U, Esser K (1982) Plasmids in *Methylobacterium clara*, a methylotrophic producer of single cell protein. *J Appl Microbiol Biotechnol* 15: 223-226
- Stark GR, Wahl GM (1984) Gene amplification. *Ann Rev Biochem* 53: 447-491
- Strandberg L, Veide A, Enfors SO (1987) Production of the hybrid protein staphylococcal protein A/*Escherichia coli* β -galactosidase with *E. coli*. *J Biotechnol* 6: 225-238
- Summers DK, Sherratt DJ (1984) Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell* 36: 1097-1103

- Sung WL, Yao FL, Zahab DM, Narang SA (1986) Short synthetic oligodeoxyribonucleotide leader sequences enhance accumulation of human proinsulin synthesized in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 83: 561-565
- Tabor S, Richardson CC (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. Proc Natl Acad Sci USA 82: 1074-1078
- Takagi H, Morinaga Y, Tsuchiya M, Ikemura H, Inouye M (1988) Control of folding of proteins secreted by a high expression secretion vector, pIN-III-ompA: 16-fold increase in production of active subtilisin E in *Escherichia coli*. Bio/Technology 6: 948-950
- Takahara M, Sagai H, Inouye S, Inouye M (1988) Secretion of human superoxide dismutase in *Escherichia coli*. Bio/Technology 6: 195-198
- Talmagde K, Gilbert W (1982) Cellular location affects protein stability in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 79: 1830-1833
- Tani Y, Yamada H (1980) Microbial utilization of C1 compounds. Biotechnol Bioengineer 22: 163-175
- Tani Y (1985) Methylootrophs for biotechnology: methanol as a raw material for fermentative production. Biotechnol Genet Engineer Rev 3: 111-135
- Tatra PK, Goodwin PM (1985) Mapping of some genes involved in C-1 metabolism in the facultative methylotroph *Methylobacterium sp.* strain AM1 (*Pseudomonas* AM1). Arch Microbiol 143: 169-177
- Taylor JW, Schmidt W, Cosstick R, Okruszek A, Eckstein F (1985a) The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA. Nucl Acids Res 13: 8749-8764
- Taylor JW, Ott J, Eckstein F (1985b) The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA. Nucl Acids Res 13: 8765-8785
- Thomas CM, Smith CA (1987) Incompatibility group P plasmids: genetics, evolution, and use in genetic manipulation. Ann Rev Microbiol 41: 77-101
- Tucker WT, Miller CA, Cohen SN (1984) Structural and functional analysis of the par region of the pSC101 plasmid. Cell 38: 191-201
- Uhlen M, Flock J, Philipson L (1981) RecE independent deletions of recombinant plasmids in *Bacillus subtilis*. Plasmid 5: 161-169
- Vehmaanperä JO, Korhola MP (1986) Stability of the recombinant plasmid carrying the *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase gene in *B. subtilis*. Appl Microbiol Biotechnol 23: 456-461

- Vieria J, Messing J (1982) The pUC plasmid, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19: 259-268
- Villa-Komaroff L, Efstratiadis A, Broome S, Lomedico P, Tizard R, Naber SP, Chick WL, Gilbert W (1978) A bacterial clone synthesizing proinsulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 3727-3731
- Walker GC (1984) Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 48: 60-93
- Walker GC (1987) The SOS response of *Escherichia coli*. In: Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, Schaechter M, Umberger HE (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. ASM, Washington D.C., pp1346-1356
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ (1982) Distantly related sequences in the α and β subunits of ATP synthase, myocin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1: 945-951
- Wang W-B, Tessman ES (1985) Evidence that the *recA441(tif-1)* mutant of *Escherichia coli* K-12 contains a thermosensitive intragenic suppressor of RecA constitutive protease activity. *J Bacteriol* 163: 407-409
- Weisberg RA (1987) Specialized transduction. In: Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, Schaechter M, Umberger HE (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. ASM, Washington D.C., pp 1169-1176
- Welmsley R, Gardner D, Oliver S (1983) Stability of a cloned gene in yeast grown in chemostat culture. *Mol Gen Genet* 192: 361-365
- West SC, Cassuto E, Mursallim J, Howard-Flanders P (1980) Recognition of duplex DNA containing single-stranded regions by *recA* protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 2569-2573
- West SC (1988) Protein-DNA interactions in genetic recombination. *TIG* 4: 8-13.
- Westlake R (1986) Large-scale continuous production of single cell protein. *Chem Ing Tech* 58: 934-937
- Willetts N (1988) Conjugation. In: Grinsted J, Bennett PM (eds) *Methods Microbiol* Vol. 21, Academic Press, London, San Diego, New York, Berkeley, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto
- Williams DC, Van Frank RM, Muth WL, Burnett JP (1982) Cytoplasmic inclusion bodies in *Escherichia coli* producing biosynthetic human insulin proteins. *Science* 215:687-689
- Williams DM, Duvall EJ, Lovett PS (1981a) Cloning restriction fragments that promote expression of a gene in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 146: 1162-1165

- Williams DM, Schoner RG, Duvall EJ, Preis LH, Lovett PS (1981b) Expression of *Escherichia coli* *trp* genes and the mouse dihydrofolate reductase gene cloned in *Bacillus subtilis*. Gene 16: 199-206
- Williams DP, Regier D, Akiyoshi D, Genbauffe F, Murphy JR (1988) Design, synthesis and expression of a human interleukin-2 gene incorporating the codon usage bias found in highly expressed *Escherichia coli* genes. Nucl Acids Res 16: 10453-10467
- Windass JD, Worsey MJ, Pioli EM, Pioli D, Barth PT, Atherton KT, Dart EC, Byrom D, Powell K, Senior PJ (1980) Improved conversion of methanol to single-cell-protein by *Methylophilus methylotrophus*. Nature 287: 396-401
- Windass JD, Newton CR, DeMaeyer-Guignard I, Moore VE, Markham AF, Edge MD (1982) The construction of a synthetic *Escherichia coli* *trp* promoter and its use in the expression of a synthetic interferon gene. Nucl Acids Res 10: 6639-6657
- Winnacker EL (1985) Gene und Klone. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- Wyman AR, Wolfe LB, Botstein D (1985) Propagation of some human DNA sequences in bacteriophage *lambda* vectors requires mutant *Escherichia coli* hosts. Proc Natl Acad Sci USA 82: 2880-2884
- Yagi Y, Clewell DB (1980) Recombination-deficient mutant of *Streptococcus faecalis*. J Bacteriol 143: 966-970
- Yanish-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33: 103-119
- Yarranton GT, Wright E, Robinson MK, Humphreys GO (1984) Dual-origin plasmid vectors whose origin of replication is controlled by the coliphage *lambda* promoter *p_L*. Gene 28: 293-300
- Young RA, Davis RW (1983) Efficient isolation of genes by using antibody probes. Proc Natl Acad Sci USA 80: 1194-1198
- Zaghloul TI, Kawamura F, Doi RH (1985) Translational coupling in *Bacillus subtilis* of a heterologous *Bacillus subtilis*-*Escherichia coli* gene fusion. J Bacteriol 164: 550-551
- Zink RT, Engwall JK, McEvoy JL, Chatterjee AK (1985) *recA* is required in the induction of pectin lyase and carotovoricin in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. J Bacteriol 164: 390-396

VIII. Anhang



Anhang, Abb.1

Restriktionskarte des 1.25 kb großen EcoRI-/HindIII-Fragmentes von *M. clara*. Die als vertikale Linien dargestellten Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme sind aus der Nukleotidsequenz abgeleitet worden. Der kodierende Sequenzabschnitt des *M. clara recA*-Genes ist über der Restriktionskarte schwarz unterlegt.

Lebenslauf

Geburtsdatum: 5. März 1961

Geburtsort: Recklinghausen

Eltern: Rolf Ridder und Barbara Ridder, geb. Kittel

Sept. 67 - Juli 71: Besuch der Volksschule "Im Romberg", Recklinghausen

Sept. 71 - Juni 80: Besuch des Hittorf-Gymnasiums, Recklinghausen

Juni 80: Allgemeine Hochschulreife

Juli 80 - Sept. 81: Grundwehrdienst

Okt. 81 - April 86: Studium der Biologie, Ruhr-Universität Bochum

Mai 86 - März 87: Anfertigung der Diplomarbeit am Lehrstuhl für Allgemeine Botanik unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. h.c. K. Esser

März 87: Abschluß des Studienganges Biologie mit dem Diplom

ab April 87: Beschäftigung als Wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Allgemeine Botanik;

ab diesem Zeitpunkt Anfertigung der Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. h.c. K. Esser

ab April 88: Beschäftigung als Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Allgemeine Botanik

Bochum, im April 1989

